



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0134152
(43) 공개일자 2024년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/74 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7025904
(22) 출원일자(국제) 2023년01월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월31일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/051537
(87) 국제공개번호 WO 2023/139255
국제공개일자 2023년07월27일
(30) 우선권주장
22152702.1 2022년01월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에이시에스 바이오 디.오.오.
슬로베니아 1000 류블랴나 테호노로스키 파크 21
(72) 발명자
바이런트, 데이비드
슬로베니아 도브 1233 울리카 7. 아브구스타 33
크루이스, 알렉산더 요하네스
슬로베니아 블레드 4260 레디나 24
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인에이아이피

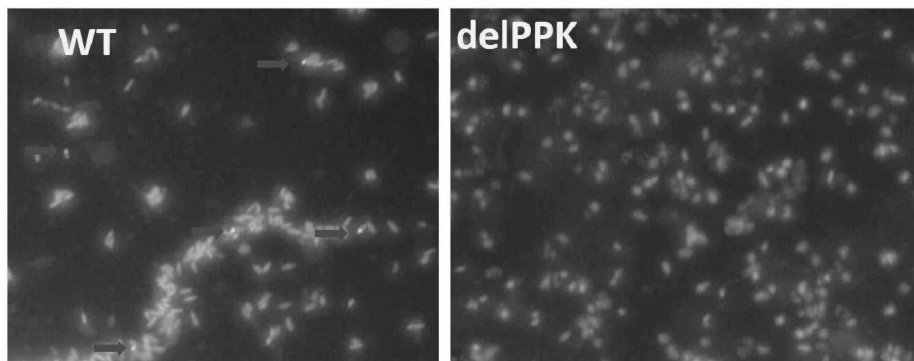
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 대량 세포 용해에 내성이 있는 유전자 변형 박테리아

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 생명공학(biotechnology engineering)에 관한 것이며, 구체적으로는 대규모 메탄올 발효에 특히 유용하게 하는 개선된 특성이 있는 메틸로바실러스(*Methylobacillus*) 속의 유전자 변형 박테리아에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 세포외다당류(exopolysaccharide, EPS)의 생산이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 메틸로바실러스 속의 박테리아를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 유전자 변형 박테리아를 사용하여 생화학 화합물을 생산하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/1229 (2013.01)

C12Y 203/01184 (2013.01)

C12Y 207/04001 (2013.01)

(72) 발명자

나고테, 토니

슬로베니아 류블랴나 1000 올리카 브라토프 우차카
르 112

코세츠, 그레고르

슬로베니아 1000 류블랴나 테흐노로스키 파크 21
에이시에스 바이오 디.오.오. 내

명세서

청구범위

청구항 1

메틸로바실러스 속에 속하며, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이, 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현이, 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 유전자 서열의 부분 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이, 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 추가로 변형된 유전자 조작 박테리아.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현이, 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

청구항 8

제7항에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 유전자 서열의 부분 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 메틸로바실러스 플라젤라투스(*Methylobacillus flagellatus*), 메틸로바실러스 글리코게네스(*Methylobacillus glycogenes*), 메틸로바실러스 프라텐시스(*Methylobacillus pratensis*), 메틸로바실러스 리조스페라(*Methylobacillus rhizosphaerae*), 메틸로바실러스 그라미네우스(*Methylobacillus gramineus*), 메틸로바실러스 아르보레우스(*Methylobacillus arboreus*), 메틸로바실러스 카리시스(*Methylobacillus caricis*) 및 메틸로바실러스 메틸로보란스(*Methylobacillus methylovorans*)에서 선택된 유전자 조작 박테리아.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 박테리아가 메틸로바실러스 플라젤라투스 또는 메틸로바실러스 글리코게네스인 유전자 조작 박테리아.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외다당류(exopolysaccharide, EPS)의 생산이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

청구항 13

적합한 배양 조건 하에서 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 유전자 조작 박테리아를 배양하는 것을 포함하는 생화학물질의 생산 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 배양 배지가 메탄올을 포함하는 방법.

청구항 15

적합한 배양 조건 하에서 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 유전자 조작 박테리아를 배양하는 것을 포함하는 바이오매스의 생산 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로 생명공학(biotechnology engineering)에 관한 것이며, 구체적으로는 대량 세포 용해(mass cell lysis)에 대한 내성을 보여 대규모 발효에 특히 유용하게 하는 유전자 변형 박테리아에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형을 가지고 있지 않는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 박테리아를 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 유전자 변형 박테리아를 사용하여 생화학 화합물을 생산하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 미생물 발효를 통한 생명공학 화학물질 생산은 석유 및 다른 화석 연료 기반 생산에 비해 더 지속 가능하고 환경 친화적인 대안이다. 몇몇 지속 가능한 발효 기질은 화학물질 생산을 위해 상업적으로 사용되었으며, 대부분 글루코스 및 자일로스와 같은 C6 및 C5 탄수화물이다. 통상 이러한 발효에 사용되는 유기체는 특히 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)이다.

[0003] 글루코스 기반은 지속 가능하지만 모든 화학물질 생산을 글루코스 기반 발효로 전환하려면 충분한 공급원료를 생산하기 위해 막대한 경작지가 필요하다. 이를 피하고 지속 가능한 화학물질 생산을 달성하는 한 가지 방법은 글루코스를 덜 토지 집약적인 공급원료로 대체하는 것이다. 메탄올이 이에 대한 가능한 후보이다. 이는 토지 필요성을 비켜가면서 이산화탄소와 수소로부터 생산될 수 있다. 이는 쉽게 저장하고 운반할 수 있으며 글루코스보다 에너지 밀도가 더 높다.

[0004] 바실러스 메탄올리쿠스(*Bacillus methanolicus*), 메틸로박테리움 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*), 메틸로바실러스 글리코게네스(*Methylobacillus glycogenes*) 및 메틸로바실러스 플라젤라투스(*Methylobacillus flagellatus*)와 같이 메탄올을 에너지와 탄소의 유일한 공급원으로 활용할 수 있는 많은 박테리아가 존재한다. 메탄올을 활용하는 박테리아 또는 메틸이용성(methylotrophic) 박테리아는 통상 영양분에 대한 접근성이 낮거나 식물 내부/식물과 밀접한 연관이 있는 가혹한 자연 환경에서 발견된다. 이러한 조건에 대한 적응은 최소 배지에서 빠르게 성장하는 능력, 및 변동하는 영양분과 산소 공급에 대한 내성과 같은 산업용 발효 미생물에 바람직한 여러 특성을 전달한다. 구체적인 예는 비축(reserve) 포스페이트를 불용성 폴리포스페이트 과립 형태로 저장하는 능력으로, 이는 폴리포스페이트 키나제(polyphosphate kinase, ppK) 효소에 의해 촉진된다. 이를 통해 유기체는 이용 가능한 경우 성장에 필요한 것보다 더 많은 포스페이트를 흡수할 수 있고, 부족할 경우 비축 포스페

이트를 활용할 수 있다. 메틸로바실러스 속 구성원은 이러한 유리한 품질을 많이 보유하고 있으며 산업용 메탄올 발효에 사용하기에 유망한 후보이다.

[0005] 그러나 일부 환경적 적응은 산업적 생명공학 맥락에서 바람직하지 않은 표현형을 초래할 수 있다. 프로그램된 세포 사멸 및 다른 세포 용해 메커니즘이 이러한 적응의 예이다. 영양소가 부족하거나 개체수가 너무 많은 경우 또는 다른 스트레스 요인에 대한 반응으로 대다수의 개별 박테리아가 용해되면 개체군 전체에 유익한 경우가 많다. 이는 살아남은 세포의 작은 하위집합에 영양분을 방출하여 더 큰 개체군이 잠재적으로 완전히 제거될 수 있는 곳에서 생존할 수 있도록 한다. 단세포 유기체의 프로그램된 세포 사멸은 단세포 유기체로부터 어느 정도의 "이기심"이 필요하기 때문에 과학계에서 최근에야 현실로 받아들여진 잘 이해되지 않은 현상이다. 구체적인 트리거는 알려지지 않았지만 퀴럼 센싱 메커니즘(quorum-sensing mechanism)과 연결되어 있다. 이러한 거동은 세포 밀도가 극도로 높은 값에 도달해야 하는 산업용 생물반응기(bioreactor)에서는 매우 바람직하지 않다. 많은 생물공정(bioprocess)에서 대부분의 생성물은 최대 세포 밀도에 도달하고 탄소가 바이오매스가 아닌 생성물 형성 방향으로 흐르기 시작한 후 정지기(stationary phase)에서 형성된다. 따라서, 많은 유기체, 예를 들어, 메틸로바실러스 중에서 생물공정의 초기 단계에서 발생하는 대량 세포 용해는 달성 가능한 생성물 수율과 역가를 크게 감소시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 생물공정의 단점, 특히 초기 단계에서 발생하는 대량 세포 용해에 관한 단점을 극복하는 것이다. 이는 대량 세포 용해에 대한 내성을 나타내는 유전자 변형 박테리아를 조작한 본 발명자들에 의해 달성되었다.

과제의 해결 수단

[0007] 메틸로바실러스 속의 모델 박테리아에 기초하여, 본 발명자들은 폴리포스페이트 키나제(PPK) 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성을 감소시킴으로써 갑작스러운 대량 세포 용해가 예기치 않게 완전히 제거되는 것을 관찰하였다. 유전자 또는 암호화된 단백질은 이전에 미생물에서 세포 용해 또는 프로그램된 세포 사멸과 연결되어 있지 않았지만, 내인성 폴리포스페이트 키나제를 포함하는 박테리아에서 이의 기능을 감소(예를 들어, 중단)시키면 모든 테스트 조건 하에서 세포 용해를 방지하였는데, 그렇지 않았다면 용해로 이어질 수 있었다. 이는 박테리아가 더 높은 세포 밀도로 배양될 수 있고 대사 활성을 유지하며 더 오랜 기간 동안 더 많은 생성물을 생산할 수 있기 때문에 화학물질 생산에서 유용성을 크게 향상시킨다.

[0008] 추가로, 본 발명자들은 아실-호모세린-락톤(Acyl-homoserine-lactone, AHL) 합성효소 기능의 감소(예를 들어, 중단)가 특정 조건(탄소 제한) 하에서 용해를 방지한다는 것을 관찰하였다.

[0009] 전술한 발견에 기초하여, 본 발명은 첫 번째 측면에서 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 적합한 배양 조건 하에서 본 발명의 박테리아를 배양하는 것을 포함하는 생화학 화합물의 생산 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 다음 항목으로 요약될 수 있다:

[0012] 1. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

[0013] 2. 항목 1에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

[0014] 3. 항목 1 또는 2에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 수준이 그렇지 않은 동일한 박테리아와 비교하여 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소된 유전자 조작 박테리아.

[0015] 4. 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

- [0016] 5. 항목 4에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0017] 6. 항목 3 또는 4에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자를 DNA 절단에 의해 선택적으로 불활성화할 수 있는 희귀 절단 엔도뉴클레아제(rare-cutting endonuclease)를 박테리아에 도입하거나 발현시킴으로써 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0018] 7. 항목 6에 있어서, 상기 희귀 절단 엔도뉴클레아제가 전사 활성인자 유사 이펙터(transcription activator-like effector, TALE) 뉴클레아제, 메가뉴클레아제(meganuclease), 징크 핑거 뉴클레아제(zinc-finger nuclease, ZFN) 또는 RNA 가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease)인 유전자 조작 박테리아.
- [0019] 8. 항목 7에 있어서, RNA 가이드 엔도뉴클레아제가 촉매 불활성 Cas9 단백질인 유전자 조작 박테리아.
- [0020] 9. 항목 8에 있어서, 세포 조건 하에서 상기 폴리펩티드를 암호화하는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 단일 가이드 RNA(single guide RNA, sgRNA)를 포함(예를 들어, 발현)하는 유전자 조작 박테리아.
- [0021] 10. 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현이 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자의 전사 및/또는 번역 억제에 의해 감소(예를 들어, 억제)되는 유전자 조작 박테리아.
- [0022] 11. 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현이 세포 조건 하에서 상기 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 억제성 핵산 분자를 박테리아에 도입하거나 발현함으로써 감소(예를 들어, 억제)되는 유전자 조작 박테리아.
- [0023] 12. 항목 11에 있어서, 억제성 핵산 분자가 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), 리보자임(ribozyme) 또는 간섭 RNA(interfering RNA, RNAi) 분자인 유전자 조작 박테리아.
- [0024] 14. 항목 12에 있어서, 간섭 RNA 분자가 마이크로 RNA(micro RNA, miRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA, shRNA)인 유전자 조작 박테리아.
- [0025] 15. 항목 1에 있어서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 해당 변형이 없는 동일한 미생물과 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0026] 16. 항목 15에 있어서, 상기 폴리펩티드의 활성이 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이에 의해 감소되어 활성의 감소 또는 손실을 초래하는 유전자 조작 박테리아.
- [0027] 17. 항목 16에 있어서, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이가 비보존 아미노산 치환(non-conservative amino acid substitution)인 유전자 조작 박테리아.
- [0028] 18. 항목 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 추가로 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0029] 19. 항목 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0030] 20. 항목 18 또는 19에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 수준이 동일한 박테리아와 비교하여 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소된 유전자 조작 박테리아.
- [0031] 21. 항목 18 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0032] 22. 항목 21에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자가 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0033] 23. 항목 21 또는 22에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는

내인성 유전자가 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자를 DNA 절단에 의해 선택적으로 불활성화할 수 있는 회귀 절단 엔도뉴클레아제를 박테리아에 도입하거나 발현시킴으로써 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

- [0034] 24. 항목 23에 있어서, 상기 회귀 절단 엔도뉴클레아제가 전사 활성인자 유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제, 메가 뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 RNA 가이드 엔도뉴클레아제인 유전자 조작 박테리아.
- [0035] 25. 항목 24에 있어서, RNA 가이드 엔도뉴클레아제가 촉매 불활성 Cas9 단백질인 유전자 조작 박테리아.
- [0036] 26. 항목 25에 있어서, 세포 조건 하에서 상기 폴리펩티드를 암호화하는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함(예를 들어, 발현)하는 유전자 조작 박테리아.
- [0037] 27. 항목 18 또는 19에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현이 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자의 전사 및/또는 번역 억제에 의해 감소(예를 들어, 억제)되는 유전자 조작 박테리아.
- [0038] 28. 항목 18 또는 19에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현이 세포 조건 하에서 상기 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 억제성 핵산 분자를 박테리아에 도입하거나 발현함으로써 감소(예를 들어, 억제)되는 유전자 조작 박테리아.
- [0039] 29. 항목 28에 있어서, 억제성 핵산 분자가 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분자인 유전자 조작 박테리아.
- [0040] 30. 항목 29에 있어서, 간섭 RNA 분자가 마이크로 RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)인 유전자 조작 박테리아.
- [0041] 31. 항목 18에 있어서, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 해당 변형이 없는 동일한 미생물과 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0042] 32. 항목 31에 있어서, 상기 폴리펩티드의 활성이 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이에 의해 감소되어 활성의 감소 또는 손실을 초래하는 유전자 조작 박테리아.
- [0043] 33. 항목 32에 있어서, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이가 비보존 아미노산 치환인 유전자 조작 박테리아.
- [0044] 34. 항목 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 중온성(mesophilic) 메틸이용성 박테리아인 유전자 조작 박테리아.
- [0045] 35. 항목 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아가 메틸로바실러스, 메틸로박테리움 또는 메틸로러브룸(*Methylobacterium*) 속, 바람직하게는 메틸로바실러스 또는 메틸로박테리움 속에 속하는 유전자 조작 박테리아.
- [0046] 36. 항목 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 메틸로바실러스 플라젤라투스, 메틸로바실러스 글리코게네스, 메틸로바실러스 프라텐시스(*Methylobacillus pratensis*), 메틸로바실러스 리조스페라(*Methylobacillus rhizosphaerae*), 메틸로바실러스 그라미네우스(*Methylobacillus gramineus*), 메틸로바실러스 아르보레우스(*Methylobacillus arboreus*), 메틸로바실러스 카리시스(*Methylobacillus caricis*), 메틸로바실러스 메틸로보란스(*Methylobacillus methilovorans*), 메틸로바실러스 종(*Methylobacillus sp.*), 메틸로박테리움 엑스토르켄스, 메틸로박테리움 오가노필룸(*Methylobacterium organophilum*) 및 메틸로러브룸 엑스토르켄스(*Methylobacterium extorquens*)에서 선택된 유전자 조작 박테리아.
- [0047] 37. 항목 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 메틸로바실러스 속에 속하는 유전자 조작 박테리아.
- [0048] 38. 항목 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 메틸로바실러스 플라젤라투스, 메틸로바실러스 글리코게네스, 메틸로바실러스 프라텐시스, 메틸로바실러스 리조스페라, 메틸로바실러스 그라미네우스, 메틸로바실러스 아르보레우스, 메틸로바실러스 카리시스, 메틸로바실러스 메틸로보란스 및 메틸로바실러스 종에서 선택된 유전자 조작 박테리아.
- [0049] 39. 항목 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아가 메틸로바실러스 플라젤라투스인 유전자 조작 박테리아.
- [0050] 40. 항목 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아가 메틸로바실러스 글리코게네스인 유전자 조작 박테리아.
- [0051] 41. 항목 37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 세포외다당류(exopolysaccharide, EPS)의 생산이 해당 변형이 없

는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.

- [0052] 42. 항목 41에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0053] 43. 항목 41 또는 42에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0054] 44. 항목 41 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 2개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0055] 45. 항목 41 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 3개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0056] 46. 항목 41 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 4개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0057] 47. 항목 41 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 5개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0058] 48. 항목 41 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 6개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0059] 49. 항목 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 모든 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아.
- [0060] 50. 항목 42 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드가 a) 서열번호 27 내지 64 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 27 내지 64 중 어느 하나와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 유전자 조작 박테리아.
- [0061] 51. 항목 42 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드가 a) 서열번호 27 내지 52 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 27 내지 52 중 어느 하나와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 유전자 조작 박테리아.
- [0062] 52. 항목 42 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드가 a) 서열번호 53 내지 64 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 53 내지 64 중 어느 하나와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 유전자 조작 박테리아.
- [0063] 53. 항목 42 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드가 a) 서열번호 65 내지 112 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 65 내지 112 중 어느 하나와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 유전자 조작 박테리아.
- [0064] 54. 항목 42 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드가 a) 서열번호 65 내지 86 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 65 내지 86 중 어느 하나와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 유전자 조작 박테리아.
- [0065] 55. 항목 42 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드가 a) 서열번호 87 내지 112 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및

b) 서열번호 87 내지 112 중 어느 하나와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 유전자 조작 박테리아.

[0066] 56. 항목 42 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드가 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소 활성(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity)이 있는 폴리펩티드, 다당류 엑스포터(polysaccharide exporter)로 작용할 수 있는 폴리펩티드; 사슬 길이 결정 단백질(chain length determinant protein)로 작용하는 폴리펩티드; 및 단백질-티로신 키나제 활성(protein-tyrosine kinase activity)이 있는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된 유전자 조작 박테리아.

[0067] 57. 항목 56에 있어서, 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소 활성이 있는 폴리펩티드가 서열번호 32와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 다당류 엑스포터로 작용할 수 있는 폴리펩티드가 서열번호 33과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 사슬 길이 결정 단백질로 작용하는 폴리펩티드가 서열번호 34와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 단백질-티로신 키나제 활성이 있는 폴리펩티드가 서열번호 35와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.

[0068] 58. 항목 56에 있어서, 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소 활성이 있는 폴리펩티드가 서열번호 68과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 다당류 엑스포터로 작용할 수 있는 폴리펩티드가 서열번호 69와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 사슬 길이 결정 단백질로 작용하는 폴리펩티드가 서열번호 70과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 단백질-티로신 키나제 활성이 있는 폴리펩티드가 서열번호 71과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.

[0069] 59. 항목 42 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드의 발현이 동일한 박테리아와 비교하여 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소되는 유전자 조작 박테리아.

[0070] 60. 항목 42 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드의 발현이 동일한 박테리아와 비교하여 중단되는 유전자 조작 박테리아.

[0071] 61. 항목 42 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 내인성 유전자(들)가 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

[0072] 62. 항목 42 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 내인성 유전자(들)가 유전자 서열의 부분 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

[0073] 63. 항목 42 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 내인성 유전자(들)가 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자를 DNA 절단에 의해 선택적으로 불활성화할 수 있는 회귀 절단 엔도뉴클레아제를 박테리아에 도입하거나 발현시킴으로써 불활성화된 유전자 조작 박테리아.

[0074] 64. 항목 63에 있어서, 상기 회귀 절단 엔도뉴클레아제가 전사 활성인자 유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 및 RNA 가이드 엔도뉴클레아제로 이루어진 군에서 선택되는 유전자 조작 박테리아.

[0075] 65. 항목 64에 있어서, RNA 가이드 엔도뉴클레아제가 촉매 불활성 Cas9 단백질인 유전자 조작 박테리아.

[0076] 66. 항목 65에 있어서, 세포 조건 하에서 상기 효소(들)를 암호화하는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 적어도 하나의 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 포함(예를 들어, 발현)하는 유전자 조작 박테리아.

[0077] 67. 항목 42 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 폴리펩티드(들)의 발현이 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 내인성 유전자(들)의 전사 및/또는 번역 억제에 의해 감소(예를 들어, 억제)되는 유전자 조작 박테리아.

[0078] 68. 항목 42 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 폴리펩티드(들)의 발현이 세포 조건 하에서 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으

로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 적어도 하나의 억제성 핵산 분자를 박테리아에 도입하거나 발현함으로써 감소 (예를 들어, 억제)되는 유전자 조작 박테리아.

- [0079] 69. 항목 68에 있어서, 억제성 핵산 분자가 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분자인 유전자 조작 박테리아.
- [0080] 70. 항목 69에 있어서, 간섭 RNA 분자가 마이크로 RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)인 유전자 조작 박테리아.
- [0081] 71. 항목 42 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 내인성 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들이 제1 EPS 유전자 클러스터 및/또는 제2 EPS 유전자 클러스터에 포함된 유전자 또는 유전자들에 의해 암호화되는 유전자 조작 박테리아.
- [0082] 72. 항목 71에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 서열번호 200 또는 203에서 발견되는 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)에 의해 정의되거나 이종상동(orthologous)인 유전자를 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0083] 73. 항목 71 또는 72에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 유전자 *epsD*, *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsB*, *epsL*, *epsH*, *epsI*, *epsJ* 및 *epsS* 또는 이들의 오솔로그(ortholog)를 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0084] 74. 항목 71 내지 73 중 어느 하나에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 유전자 *epsD*, *epsE*, *epsF* 및 *epsG* 또는 이들의 오솔로그를 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0085] 75. 항목 71 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 서열번호 200 또는 203의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0086] 76. 항목 71 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 서열번호 200의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0087] 77. 항목 71 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 EPS 유전자 클러스터의 적어도 하나의 유전자가, 예를 들어, 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0088] 78. 항목 71 내지 77 중 어느 하나에 있어서, *epsD*, *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsB*, *epsL*, *epsH*, *epsI*, *epsJ* 및 *epsS* 또는 이들의 오솔로그에서 선택된 적어도 하나의 유전자가, 예를 들어, 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0089] 79. 항목 71 내지 78 중 어느 하나에 있어서, *epsD*, *epsE*, *epsF* 및 *epsG* 또는 이들의 오솔로그에서 선택된 적어도 하나의 유전자가, 예를 들어, 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0090] 80. 항목 71 내지 79 중 어느 하나에 있어서, 유전자 *epsD*, *epsE*, *epsF* 및 *epsG* 또는 이들의 오솔로그가, 예를 들어, 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0091] 81. 항목 79 또는 80에 있어서, 유전자 *epsD*가 서열번호 32와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하고, 유전자 *epsE*가 서열번호 33과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하며, 유전자 *epsF*가 서열번호 34와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하고, 유전자 *epsG*가 서열번호 35와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자 조작 박테리아.
- [0092] 82. 항목 81에 있어서, 유전자 *epsD*가 서열번호 118과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 유전자 *epsE*가 서열번호 119와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 유전자 *epsF*가 서열번호 120과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 유전자 *epsG*가 서열번호 121과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0093] 83. 항목 79 또는 80에 있어서, 유전자 *epsD*가 서열번호 68과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하고, 유전자 *epsE*가 서열번호 69와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하며, 유전자 *epsF*가 서열번호 70과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하고, 유전자 *epsG*가 서열번호 71과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자 조작 박테리아.
- [0094] 84. 항목 83에 있어서, *epsD* 유전자가 서열번호 154와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을

포함하고, 유전자 *epsE*가 서열번호 155와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 유전자 *epsF*가 서열번호 156과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 유전자 *epsG*가 서열번호 157과 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.

- [0095] 85. 항목 71 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0096] 86. 항목 71 내지 85 중 어느 하나에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 상기 클러스터의 일부 또는 전체 서열 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0097] 87. 항목 71 내지 85 중 어느 하나에 있어서, 제1 EPS 유전자 클러스터가 프로모터(promoter) 및/또는 리보솜 결합 부위(ribosome binding site) 영역의 변형에 의해(예를 들어, 적어도 하나의 돌연변이를 도입함으로써) 불활성화되어 유전자 발현이 결여되는 유전자 조작 박테리아.
- [0098] 88. 항목 71 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 제2 EPS 유전자 클러스터가 서열번호 201 또는 205에서 발견되는 오픈 리딩 프레임(ORF)에 의해 정의되거나 이중상동인 유전자를 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0099] 89. 항목 71 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 제2 EPS 유전자 클러스터가 201 또는 205의 뉴클레오티드 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0100] 90. 항목 71 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 제2 EPS 유전자 클러스터가 201의 뉴클레오티드 서열과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작 박테리아.
- [0101] 91. 항목 71 내지 90 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 EPS 유전자 클러스터의 적어도 하나의 유전자가, 예를 들어, 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0102] 92. 항목 71 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 제2 EPS 유전자 클러스터가 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0103] 93. 항목 71 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 제2 EPS 유전자 클러스터가 상기 클러스터 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된 유전자 조작 박테리아.
- [0104] 94. 항목 71 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 제2 EPS 유전자 클러스터가 프로모터 및/또는 리보솜 결합 부위 영역의 변형에 의해(예를 들어, 적어도 하나의 돌연변이를 도입함으로써) 불활성화되어 유전자 발현이 결여되는 유전자 조작 박테리아.
- [0105] 95. 항목 40 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 효소를 암호화하는 모든 내인성 유전자가 불활성화된, 예를 들어, 결실된 유전자 조작 박테리아.
- [0106] 96. 적합한 배양 조건 하에서 항목 1 내지 95 중 어느 하나에 따른 박테리아를 배양하는 것을 포함하는 생화학 물질의 생산 방법.
- [0107] 97. 항목 96에 있어서, 환원된 1-탄소 화합물, 예컨대 메탄올, 또는 탄소-탄소 결합을 함유하지 않는 다중 탄소 화합물, 예컨대 디메틸에테르 및 디메틸아민을 포함하는 배양 배지에서 적합한 배양 조건 하에 항목 40 내지 95 중 어느 하나에 따른 박테리아를 배양하는 것을 포함하는 방법.
- [0108] 98. 항목 97에 있어서, 배양 배지가 메탄올을 포함하는 방법.
- [0109] 99. 항목 96 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 배양이 생물반응기에서 수행되는 방법.
- [0110] 100. 항목 96 내지 99 중 어느 하나에 있어서, 생화학 화합물이 유기산, 아미노산, 지방산 및 이들의 유도체에 선택되는 방법.
- [0111] 101. 적합한 배양 조건 하에서 항목 1 내지 95 중 어느 하나에 따른 박테리아를 배양하는 것을 포함하는 바이오매스의 생산 방법.

도면의 간단한 설명

- [0112] **도 1:** DAPI로 염색된 메틸로바실러스 플라젤라투스 세포의 400배 배율 형광 이미지로, 왼쪽은 야생형 세포이고 오른쪽은 ppK 결실 세포임. 화살표는 DAPI 염색으로 노란색으로 염색된 폴리포스페이트 과립을 가리킨다.
- 도 2:** 야생형 메틸로바실러스 플라젤라투스(위) 및 ppK 결핍 메틸로바실러스 플라젤라투스(아래)를 사용한 발효의 바이오매스 생산 생물공정 플롯.
- 도 3:** 글루타메이트 탈수소효소(glutamate dehydrogenase) 효소를 발현하는 야생형 메틸로바실러스 플라젤라투스

스(위) 및 ppK 결핍 메틸로바실러스 플라젤라투스(아래)를 사용한 발효의 GABA 생산 생물공정 플롯.

도 4: 다른 유기체로부터의 알려진 N-아실 호모세린 락톤 생산 클러스터가 포함된 항SMASH 알고리즘 출력의 화면 캡처.

도 5: 야생형 메틸로바실러스 플라젤라투스(위) 및 AHL 합성효소 결핍 메틸로바실러스 플라젤라투스(아래)를 사용한 발효의 바이오매스 생산 생물공정 플롯.

도 6: 가수분해된 M. 플라젤라투스 진탕 플라스크 상청액의 당 함량. 어두운 회색 막대는 총 글루코스(mg/L)를 나타내고 밝은 회색 막대는 총 단량체 당을 나타낸다. 오차 막대는 기술 복제의 표준 편차이다.

도 7: 상이한 메틸로바실러스 플라젤라투스 균주에 의해 생산된 생물반응기 브로스(broth)의 측정된 점도.

도 8: 야생형 M. 플라젤라투스 및 24시간 인큐베이션 후 M. 글리코게네스 배양물 사진. 왼쪽부터 야생형 ABME 5 및 6에 이어서 M. 플라젤라투스의 단일 클러스터 파괴와 마지막으로 이중 파괴로 이어짐.

도 9: ABME 6 및 ABME 131의 두 가지 대표적인 생물반응기 발효 동안 발효 시간(x축)과 관련된 소포체 첨가(y축) 플롯.

도 10: 야생형 메틸로바실러스 플라젤라투스(왼쪽) 대 이중 파괴 균주 ABME 131(오른쪽)의 생물반응기 발효액의 위상차 현미경법(phase-contrast microscopy) 이미지.

도 11: 모균주와 비교한 EPS가 없는 ABME131의 개선된 성장.

이제 본 발명을 아래에서 더 자세히 설명한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0113] 본원에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 통상 생화학, 유전학 및 미생물학 분야의 숙련된 기술자가 이해하는 것과 동일한 의미이다.

[0114] 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 모든 방법 및 재료는 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있으며, 적합한 방법 및 재료는 본원에 기술되어 있다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그 전체가 참조로 포함된다. 상충되는 경우, 정의를 포함한 본원이 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 달리 명시되지 않는 한 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다.

[0115] 본 발명의 실시는 달리 명시하지 않는 한, 당업계의 기술 내에 있는 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 유전자도입 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 자세히 설명되어 있다. 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook 등, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis 등, 미국 특허 제4,683,195호; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); 시리즈, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson 및 M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), 구체적으로 Vol. 154 및 155 (Wu 등 eds.) 및 Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller 및 M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) 참고.

[0116] 본 발명의 박테리아

[0117] 위에서 나타난 바와 같이, 본 발명은 생물공정의 특정 결점, 특히 대량 세포 용해가 박테리아에서 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성을 감소시킴으로써 극복될 수 있다는 예상치 못한 놀라운 발견에 기초한다.

[0118] 따라서, 본 발명은 첫 번째 측면에서 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형된 유전자 조작 박테리아를 제공한다.

[0119] "폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드"는 다음 반응을 촉매하는 폴리펩티드이다: $ATP + (포스페이트)_n$

$\rightleftharpoons \text{ADP} + (\text{포스페이트})_{n+1}$ (EC 2.7.4.1). *ppk* 유전자에 의해 암호화되는 폴리포스페이트 키나제(PPK)는 메틸로바실러스 플라젤라투스 및 메틸로바실러스 글리코게네스와 같은 메틸영양체(methylotroph)를 포함한 많은 박테리아에 고도로 보존되어 있으며, 박테리아가 영양 결박(nutritional stringency) 및 환경 스트레스에 적응하는 능력에 중요한 역할을 한다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 비제한적인 예는 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 및 11에 제공된다.

[0120] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0121] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 2에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 2에 제시된 핵산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 2에 제시된 핵산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0122] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0123] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 4에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 4에 제시된 핵산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 4에 제시된 핵산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0125] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 6에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 6에 제시된 핵산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 6에 제시된 핵산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0126] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0127] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 8에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 8에 제시된 핵산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 8에 제시된 핵산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0128] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0129] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 10에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 10에 제시된 핵산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 10에 제시된 핵산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0130] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0131] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 12에 제시된 핵산 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 12에 제시된 핵산 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 서열번호 12에 제시된 핵산 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0132] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형될 수 있다.
- [0133] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형될 수 있다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 수준은 그렇지 않은 동일한 박테리아와 비교하여, 예를 들어, 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소될 수 있다.
- [0134] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자의 발현 수준이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형될 수 있다. 내인성 유전자의 발현 수준은 그렇지 않은 동일한 박테리아와 비교하여, 예를 들어, 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소될 수 있다.
- [0135] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 예컨대 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화되었다.
- [0136] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 상기 효소를 암호화하는 내인성 유전자를 DNA 절단, 바람직하게는 이중 가닥 절단(double-strand break)에 의해 선택적으로 불활성화할 수 있는 회귀 절단 엔도뉴클레아제를 미생물에 도입하거나 발현함으로써

불활성화되었다. 내인성 유전자를 불활성화하기 위해 본 발명에 따라 사용되는 희귀 절단 엔도뉴클레아제는, 예를 들어, 전사 활성인자 유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 RNA 가이드 엔도뉴클레아제일 수 있다.

- [0137] 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자를 불활성화하는 한 가지 방법은 CRISPRi 시스템을 사용하는 것이다. CRISPRi 시스템은 유전자 발현의 표적화된 억제 또는 게놈 상의 표적 위치 차단을 위한 도구로 개발되었다. CRISPRi 시스템은 촉매 불활성인 "죽은" Cas9 단백질(dCas9)과 DNA에 대한 dCas9의 결합 부위를 정의하는 가이드 RNA로 이루어진다.
- [0138] 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 촉매 불활성 Cas9 단백질과 같은 RNA 가이드 엔도뉴클레아제 및 세포 조건 하에서 상기 폴리펩티드를 암호화하는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 박테리아에 도입하거나 발현함으로써 불활성화된다.
- [0139] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현은 억제에 의해 감소된다.
- [0140] 상기 내인성 폴리펩티드의 발현 억제는 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 발현은 억제성 핵산 분자, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분자, 예컨대 마이크로RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)의 사용을 포함하는 유전자 침묵(gene silencing) 기술에 의해 억제될 수 있다.
- [0141] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자의 전사 및/또는 번역 억제에 의해 감소(예를 들어, 억제)된다.
- [0142] 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현은 억제성 핵산 분자를 박테리아에 도입하거나 발현시킴으로써 억제된다. 예를 들어, 억제성 핵산 분자는 박테리아에서 기능적인 프로모터, 예컨대 유도성 프로모터(inducible promoter)에 작동 가능하게 연결된 상기 억제성 핵산 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 통해 도입되어 상기 억제성 핵산 분자를 생산할 수 있다. 적합하게는, 억제성 핵산 분자는 세포 조건 하에서 내인성 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 분자이다. 표적에 따라, 암호화 게놈 DNA의 전사 및/또는 암호화 mRNA의 번역이 억제된다.
- [0143] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분자이다. 바람직하게는, 이러한 핵산 분자는 관심 폴리펩티드 또는 효소를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA(예를 들어, 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA)의 상보체의 적어도 10개의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0144] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 조건 하에서 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 핵산 분자(DNA 또는 RNA)이다.
- [0145] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 해머헤드 리보자임(hammerhead ribozyme)과 같은 리보자임이다. 리보자임 분자는 폴리펩티드의 번역을 방지하기 위해 mRNA 전사물을 촉매적으로 절단하도록 설계되었다.
- [0146] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 간섭 RNA(RNAi) 분자이다. RNA 간섭은 RNA 분자가 발현을 억제하여 전형적으로 특정 mRNA를 파괴하는 생물 공정이다. RNAi 분자의 예시적인 유형에는 마이크로RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)가 포함된다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 miRNA이다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 siRNA이다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 shRNA이다.
- [0147] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형되었다.
- [0148] 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드의 활성 감소는 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 활성 부위에 하나 이상의 돌연변이를 도입하여 활성을 감소시킴으로써 활성의 감소 또는 상실을 초래할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성은 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이에 의해 감소되어 활성의 감소 또는 상실을

조래한다. 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는, 예를 들어, 적어도 하나의 비보존 아미노산 치환일 수 있다.

- [0149] 예를 들어, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 감소되는 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 활성 부위의 일부를 형성하는, 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열의 R379, S384, F492, P511, R568, R625, Q679, H439 및 H458 위치 중 어느 하나에서 발생할 수 있다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 이중상동 폴리펩티드의 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열의 R379, S384, F492, P511, R568, R625, Q678, H439 및 H458 위치 중 어느 하나에 해당하는 위치에 있을 수 있다.
- [0150] 다른 예로서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 메틸로바실러스 글리코게네스에서 감소되는 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 활성 부위의 일부를 형성하는, 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 R79, S84, F192, P211, R268, R325, Q378, H139 위치 중 어느 하나에서 발생할 수 있다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 이중상동 폴리펩티드의 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 R79, S84, F192, P211, R268, R325, Q378, H139, H158 위치 중 어느 하나에 해당하는 위치에 있을 수 있다.
- [0151] 다른 예로서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 메틸로바실러스 리조스페라에서 감소되는 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 활성 부위의 일부를 형성하는, 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열의 R379, S384, F492, P511, R568, R625, Q678, H439 및 H458 위치 중 어느 하나에서 발생할 수 있다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 이중상동 폴리펩티드의 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열의 R379, S384, F492, P511, R568, R625, Q678, H439 및 H458 위치 중 어느 하나에 해당하는 위치에 있을 수 있다.
- [0152] 다른 예로서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 메틸로박테리움 오가노필룸에서 감소되는 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 활성 부위의 일부를 형성하는, 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 R392, S397, F505, P524, R581, R643, H452 및 H471 위치 중 어느 하나에서 발생할 수 있다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 이중상동 폴리펩티드의 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열의 R392, S397, F505, P524, R581, R643, H452 및 H471 위치 중 어느 하나에 해당하는 위치에 있을 수 있다.
- [0153] 다른 예로서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 메틸로박테리움 엑스토르켄스에서 감소되는 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 활성 부위의 일부를 형성하는, 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열의 R451, S456, F564, P583, R640, R702, H511 및 H530 위치 중 어느 하나에서 발생할 수 있다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 이중상동 폴리펩티드의 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열의 R451, S456, F564, P583, R640, R702, H511 및 H530 위치 중 어느 하나에 해당하는 위치에 있을 수 있다.
- [0154] 다른 예로서, 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 대장균에서 감소되는 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 활성 부위의 일부를 형성하는, 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열의 R375, S380, F488, P507, R564, R621, Q674, H435 및 H454 위치 중 어느 하나에서 발생할 수 있다. 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 이중상동 폴리펩티드의 경우, 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는 서열번호 11에 제시된 아미노산 서열의 R375, S380, F488, P507, R564, R621, Q674, H435 및 H454 위치 중 어느 하나에 해당하는 위치에 있을 수 있다.
- [0155] 세포 용해에 대한 이러한 박테리아의 내성은 특히 탄소 제한과 같은 특정 조건 하에서 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성을 감소시킴으로써 더욱 개선될 수 있다.
- [0156] 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 발현 및/또는 활성이 감소하도록 추가로 변형될 수 있다.
- [0157] "아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 폴리펩티드"는 다음 반응을 촉매하는 폴리펩티드이다: 아실-[아실-캐리어-단백질] + S-아데노실-L-메티오닌 $\rightleftharpoons$ [아실-캐리어-단백질] + S-메틸-5'-티오아데노신 + N-아실-L-호모세린 락톤(EC 2.3.1.184). 아실-호모세린 락톤(AHL)은 많은 그람 음성 박테리아가 개체군 밀도에 따라 거동을 조정하기 위해 사용하는 작은 신호 분자이다. 생합성과 이러한 분자 신호의 감지에 기초하며 정족수 감지(Quorum Sensing, QS)라고 하는 이 과정은 성장, 병독성, 생물막 형성 및 독소 생성을 포함한 다양한 유전자 발

티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형될 수 있다.

- [0173] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형될 수 있다. 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현 수준은 동일한 박테리아와 비교하여, 예를 들어, 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소될 수 있다.
- [0174] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자의 발현 수준이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형될 수 있다. 내인성 유전자의 발현 수준은 동일한 박테리아와 비교하여, 예를 들어, 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소될 수 있다.
- [0175] 일부 실시양태에 따르면, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 예컨대 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화되었다.
- [0176] 일부 실시양태에 따르면, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 상기 효소를 암호화하는 내인성 유전자를 DNA 절단, 바람직하게는 이중 가닥 절단에 의해 선택적으로 불활성화할 수 있는 회귀 절단 엔도뉴클레아제를 미생물에 도입하거나 발현함으로써 불활성화되었다. 내인성 유전자를 불활성화하기 위해 본 발명에 따라 사용되는 회귀 절단 엔도뉴클레아제는, 예를 들어, 전사 활성인자 유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 RNA 가이드 엔도뉴클레아제일 수 있다.
- [0177] 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자를 불활성화하는 한 가지 방법은 CRISPRi 시스템을 사용하는 것이다. CRISPRi 시스템은 유전자 발현의 표적화된 억제 또는 게놈 상의 표적 위치 차단을 위한 도구로 개발되었다. CRISPRi 시스템은 촉매 불활성인 "죽은" Cas9 단백질(dCas9)과 DNA에 대한 dCas9의 결합 부위를 정의하는 가이드 RNA로 이루어진다.
- [0178] 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자는 박테리아에 촉매 불활성 Cas9 단백질과 같은 RNA 가이드 엔도뉴클레아제 및 세포 조건 하에서 상기 폴리펩티드를 암호화하는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 박테리아에 도입하거나 발현함으로써 불활성화된다.
- [0179] 일부 실시양태에 따르면, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현은 억제제를 통해 감소된다.
- [0180] 상기 내인성 폴리펩티드의 발현 억제는 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 발현은 억제성 핵산 분자, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분자, 예컨대 마이크로RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)의 사용을 포함하는 유전자 침묵 기술에 의해 억제될 수 있다.
- [0181] 일부 실시양태에 따르면, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 상기 내인성 폴리펩티드의 발현은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자의 전사 및/또는 번역 억제에 의해 감소(예를 들어, 억제)된다.
- [0182] 일부 실시양태에 따르면, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 발현은 억제성 핵산 분자를 박테리아에 도입하거나 발현함으로써 억제된다. 예를 들어, 억제성 핵산 분자는 박테리아에서 기능적인 프로모터, 예컨대 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 억제성 핵산 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 통해 도입되어 상기 억제성 핵산 분자를 생산할 수 있다. 적합하게는, 억제성 핵산 분자는 세포 조건 하에서 내인성 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 분자이다. 표적에 따라, 암호화 게놈 DNA의 전사 및/또는 암호화 mRNA의 번역이 억제된다.
- [0183] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분자이다. 바람직하게는, 이러한 핵산 분자는 관심 폴리펩티드 또는 효소를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA(예를 들어, 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA)의 상보체의 적어도 10개의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0184] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 조건 하에서 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 핵산 분자(DNA 또는 RNA)이다.
- [0185] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 해머헤드 리보자임과 같은 리보자임이다. 리보자임 분자는 폴리펩티드의 번역을 방지하기 위해 mRNA 전사물을 촉매적으로 절단하도록 설계되었다.
- [0186] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 간섭 RNA(RNAi) 분자이다. RNA 간섭은 RNA 분자가 발현을 억제하여 전형적으로 특정 mRNA를 파괴하는 생물학적 과정이다. RNAi 분자의 예시적인 유형에는 마이크로RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)가 포함된다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 miRNA이다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 siRNA이다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 shRNA이다.
- [0187] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 변형되었다.
- [0188] 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 폴리펩티드의 활성 감소는 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 활성 부위에 하나 이상의 돌연변이를 도입하여 활성을 감소 시킴으로써 활성의 감소 또는 손실을 초래할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 아실-호모세린-락톤(AHL) 합성효소 활성이 있는 내인성 폴리펩티드의 활성은 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이에 의해 감소되어 활성의 감소 또는 손실을 초래한다. 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는, 예를 들어, 적어도 하나의 비보존 아미노산 치환일 수 있다.
- [0189] 일반적으로, 본원에 언급된 바와 같은 박테리아는 게놈 내에 폴리포스페이트 키나제 활성이 있는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 함유하는 한 임의의 적합한 박테리아일 수 있다. 박테리아는 그람 양성이거나 그람 음성일 수 있다. 바람직하게는, 박테리아는 그람 음성 박테리아이다. 그람 음성 박테리아에 대한 비제한적인 예에는 메틸로바실러스, 메틸로박테리움, 메틸로러브룸, 에스케리키아(*Escherichia*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*) 및 시트로박터(*Citrobacter*) 속의 종이 포함된다. 그람 양성 박테리아의 비제한적인 예에는 바실러스, 락토코커스(*Lactococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 지오바실러스(*Geobacillus*), 페디오코커스(*Pediococcus*), 무렐라(*Moorella*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 및 셀룰로모나스(*Cellulomonas*) 속의 종이 포함된다.
- [0190] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸이용성 박테리아, 바람직하게는 중온성 메틸이용성 박테리아이다.
- [0191] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로필라세에(*Methylophilaceae*) 또는 메틸로박테리아세에(*Methylobacteriaceae*) 과에 속한다.
- [0192] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로필라세에 과에 속한다.
- [0193] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로박테리아세에 과에 속한다.
- [0194] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실러스, 메틸로박테리움 또는 메틸로러브룸 속에 속한다.
- [0195] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실루스 또는 메틸로박테리움 속에 속한다.
- [0196] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로박테리움 또는 메틸로러브룸 속에 속한다.
- [0197] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실러스 플라젤라투스, 메틸로바실러스 글리코게네스, 메틸로바실러스 프라텐시스, 메틸로바실러스 리조스페레, 메틸로바실러스 그라미네우스, 메틸로바실러스 아르보레우스, 메틸로바실러스 카리시스, 메틸로바실러스 메틸로보란스, 메틸로바실러스 종, 메틸로박테리움 엑스토르켄스, 메틸로박테리움 오가노필룸 및 메틸로러브룸 엑스토르켄스에서 선택된다.
- [0198] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실러스 속에 속한다.
- [0199] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실러스 플라젤라투스, 메틸로바실러스 글리코게네스, 메틸로바실러스 프라텐시스, 메틸로바실러스 리조스페레, 메틸로바실러스 그라미네우스, 메틸로바실러스 아르보레우스, 메틸로바실러스 카리시스, 메틸로바실러스 메틸로보란스 및 메틸로바실러스 종에서 선택된다.
- [0200] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실러스 플라젤라투스이다.

- [0201] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실러스 글리코게네스이다.
- [0202] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 메틸로바실러스 리조스패레이다.
- [0203] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 장내세균(*Enterobacteriaceae*) 과에 속한다.
- [0204] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 에스케리키아 속에 속한다.
- [0205] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 대장균이다.
- [0206] 본 발명자들은 메틸로바실러스에서 일반적인 EPS 생산을 추가로 연구하였다. *M. 플라젤라투스* 및 *M. 글리코게네스* 계통의 생물정보학적 분석에 기초하여, 본 발명자들은 2개의 추정 EPS 생산 유전자 클러스터를 확인하였다. 두 EPS 클러스터의 파괴로 인해 EPS 생산이 완전히 중단되었다.
- [0207] 변형된 *M. 플라젤라투스* 및 *M. 글리코게네스* 균주에서 예상치 못한 놀라운 관찰은 성장 배양에서 이들의 거동이 었다. 메틸로바실러스 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 하나 이상의 내인성 폴리펩티드의 발현을 중단할 때, 배양은 메탄을 기반 생물공정의 개발에 유익한 여러 가지 놀랍고 예상치 못한 특성을 보였다. 예기치 않게 진탕 플라스크와 생물반응기 모두에서 과도한 배양물 거품이 감소하였다. 더욱이, 변형되지 않은 모 균주에서는 세포 응집이 관찰되었지만, 변형된 메틸로바실러스의 배양에서는 이것이 감소되거나 심지어 전혀 없 었다. EPS 생산이 제거되면 바이오매스의 원심분리 및 여과도 개선되었다. 이러한 결합된 특성은 생물공정, 균 주 처리 및 다운스트림 처리를 크게 개선하여 변형된 메틸로바실러스 박테리아를 대규모 메탄을 발효에 적합하 게 만든다. 예기치 않게 EPS 합성을 제거하면 *M. 플라젤라투스* 및 다른 메틸로바실러스 종의 메탄을 내성도 개 선되었다.
- [0208] 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 메틸로바실러스 속에 속하는 본 발명의 박테리아는 세포외다당류(EPS)의 생산 이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 추가로 변형될 수 있다. 더 구체적으로, 이러한 메틸로바실러스 속의 유전자 조작된 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 내인성 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성이 감소하도록 변 형될 수 있다.
- [0209] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하도 록 변형되었다.
- [0210] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하도 록 변형되었다.
- [0211] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하도 록 변형되었다.
- [0212] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하도 록 변형되었다.
- [0213] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하 도록 변형되었다.
- [0214] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 11개, 예컨대 적어도 12개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하 도록 변형되었다.
- [0215] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에 서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 13개, 예컨대 적어도 14개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하 도록 변형되었다.
- [0216] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에

서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 15개, 예컨대 적어도 16개의 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하도록 변형되었다.

- [0217] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 모든 내인성 폴리펩티드의 발현이 감소하도록 변형되었다.
- [0218] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드는 a) 서열번호 27 내지 64 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 27 내지 64 중 어느 하나와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0219] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드는 a) 서열번호 27 내지 52 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 27 내지 52 중 어느 하나와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0220] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드는 a) 서열번호 53 내지 64 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 53 내지 64 중 어느 하나와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0221] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드는 a) 서열번호 65 내지 112 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 65 내지 112 중 어느 하나와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0222] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드는 a) 서열번호 65 내지 86 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 65 내지 86 중 어느 하나와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0223] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 효소는 a) 서열번호 87 내지 112 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 b) 서열번호 87 내지 112 중 어느 하나와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 기준 폴리펩티드와 동일한 기능적 특성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0224] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드는 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소 활성이 있는 폴리펩티드, 다당류 엑스포터로 작용할 수 있는 폴리펩티드; 사슬 길이 결정 단백질로 작용하는 폴리펩티드; 및 단백질-티로신 키나제 활성이 있는 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0225] 일부 실시양태에 따르면, 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 32와 적어도 70%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0226] 일부 실시양태에 따르면, 다당류 엑스포터로 작용할 수 있는 폴리펩티드는 서열번호 33과 적어도 70%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0227] 일부 실시양태에 따르면, 사슬 길이 결정 단백질로 작용하는 폴리펩티드는 서열번호 34와 적어도 70%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0228] 일부 실시양태에 따르면, 단백질-티로신 키나제 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 35와 적어도 70%, 예컨대

적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0229] 일부 실시양태에 따르면, 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 68과 적어도 70%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0230] 일부 실시양태에 따르면, 다당류 엑스포터로 작용할 수 있는 폴리펩티드는 서열번호 69와 적어도 70%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0231] 일부 실시양태에 따르면, 사슬 길이 결정 단백질로 작용하는 폴리펩티드는 서열번호 70과 적어도 70%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0232] 일부 실시양태에 따르면, 단백질-티로신 키나제 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 71과 적어도 70%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0233] 내인성 폴리펩티드(들)의 발현 수준은 동일한 박테리아와 비교하여, 예를 들어, 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100% 감소될 수 있다.
- [0234] 내인성 폴리펩티드(들)의 발현 감소는 당업계에서 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 내인성 유전자(들)를 예컨대 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화함으로써 발현이 감소될 수 있다.
- [0235] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드의 발현은 동일한 박테리아와 비교하여 중단된다.
- [0236] 일부 실시양태에 따르면, 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 내인성 유전자(들)는 예컨대 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화되었다.
- [0237] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 상기 폴리펩티드(들)를 암호화하는 내인성 유전자(들)는 상기 효소를 암호화하는 내인성 유전자를 DNA 절단에 의해 선택적으로 불활성화할 수 있는 회귀 절단 엔도뉴클레아제를 박테리아에 도입하거나 발현함으로써 불활성화되었다. 내인성 유전자를 불활성화하기 위해 본 발명에 따라 사용되는 회귀 절단 엔도뉴클레아제는, 예를 들어, 전사 활성인자 유사 이펙터 (TALE) 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 RNA 가이드 엔도뉴클레아제일 수 있다.
- [0238] 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자를 불활성화하는 한 가지 방법은 CRISPRi 시스템을 사용하는 것이다. CRISPRi 시스템은 유전자 발현의 표적화된 억제 또는 게놈 상의 표적 위치 차단을 위한 도구로 개발되었다. CRISPRi 시스템은 촉매 불활성인 "죽은" Cas9 단백질(dCas9)과 DNA에 대한 dCas9의 결합 부위를 정의하는 가이드 RNA로 이루어진다.
- [0239] 일부 실시양태에 따르면, 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 내인성 폴리펩티드의 발현은 억제를 통해 감소된다.
- [0240] 상기 폴리펩티드의 발현 억제는 당업계에서 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 발현은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분자, 예컨대 마이크로RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)와 같은 억제성 핵산 분자의 사용을 포함하는 유전자 침묵 기술에 의해 억제될 수 있다.
- [0241] 일부 실시양태에 따르면, 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 내인성 폴리펩티드의 발현은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자의 전사 및/또는 번역 억제에 의해 감소(예를 들어, 억제)된다.
- [0242] 일부 실시양태에 따르면, 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 내인성 폴리펩티드의 발현은 박테리아에 억제성 핵산 분자를 도입하거나 발현함으로써 억제된다. 예를 들어, 억제성 핵산 분자는 박테리아에서 기능적인 프로모터, 예컨대 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 억제성 핵산 분자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 외인성 핵산 분자를 통해 도입되어 상기 억제성 핵산 분자를 생산할 수 있다. 적합하게는, 억제성 핵산 분자는 세포 조건 하에서 해당 내인성 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 것이다. 표적에 따라, 암호화 게놈 DNA의 전사 및/또는 암호화 mRNA의 번역이 억제된다.
- [0243] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 또는 간섭 RNA(RNAi) 분

자이다. 바람직하게는, 이러한 핵산 분자는 해당 폴리펩티드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA의 상보체의 적어도 10개의 연속 뉴클레오티드를 포함한다.

- [0244] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 이러한 안티센스 올리고뉴클레오티드는 세포 조건 하에서 해당 효소를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 핵산 분자(DNA 또는 RNA)이다.
- [0245] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 해머헤드 리보자임과 같은 리보자임이다. 리보자임 분자는 해당 폴리펩티드가 번역되는 것을 방지하기 위해 mRNA 전사물을 촉매적으로 절단하도록 설계되었다.
- [0246] 일부 실시양태에 따르면, 억제성 핵산 분자는 간섭 RNA(RNAi) 분자이다. RNA 간섭은 RNA 분자가 발현을 억제하여 전형적으로 특정 mRNA를 파괴하는 생물학적 과정이다. RNAi 분자의 예시적인 유형에는 마이크로RNA(miRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)가 포함된다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 miRNA이다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 siRNA이다. 일부 실시양태에 따르면, RNAi 분자는 shRNA이다.
- [0247] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 폴리펩티드의 기능(예를 들어, 활성)이 해당 변형이 없는 동일한 미생물과 비교하여 감소하도록 변형되었다.
- [0248] 적어도 하나의 내인성 폴리펩티드의 기능(예를 들어, 활성)의 감소는 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드가 효소인 경우, 효소의 활성 부위에 하나 이상의 돌연변이를 도입하여 활성을 감소시킴으로써 활성의 감소 또는 상실을 초래할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 적어도 하나의 내인성 효소의 활성은 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이에 의해 감소되어 활성의 감소 또는 상실을 초래한다. 적어도 하나의 활성 부위 돌연변이는, 예를 들어, 적어도 하나의 비보존 아미노산 치환일 수 있다.
- [0249] 위에서 언급한 바와 같이, 본 발명자들은 메틸로바실러스의 게놈에서 2개의 추정 EPS 유전자 클러스터를 확인하였다. 따라서, 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 내인성 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들은 제1 EPS 유전자 클러스터 및/또는 제2 EPS 유전자 클러스터에 포함된 유전자 또는 유전자들에 의해 암호화된다.
- [0250] 일부 실시양태에 따르면, 상기 박테리아에서 세포외다당류(EPS)의 생산에 관련된 내인성 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들은 제1 EPS 유전자 클러스터 및/또는 제2 EPS 유전자 클러스터에 포함된 유전자 또는 유전자들에 의해 암호화된다.
- [0251] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200 또는 203에서 발견되는 오픈 리딩 프레임(ORF)에 의해 정의되거나 이중상동성인 유전자를 포함한다.
- [0252] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 유전자 *epsD*, *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsB*, *epsL*, *epsH*, *epsI*, *epsJ* 및 *epsS* 또는 이들의 오솔로그를 포함한다.
- [0253] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 유전자 *epsD*, *epsE*, *epsF* 및 *epsG* 또는 이들의 오솔로그를 포함한다.
- [0254] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200 또는 203의 뉴클레오티드 서열과 적어도 50%, 예컨대 적어도 55%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200 또는 203의 뉴클레오티드 서열과 적어도 60%, 예컨대 적어도 65%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200 또는 203의 뉴클레오티드 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200 또는 203의 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200 또는 203의 뉴클레오티드 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 93%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200 또는 203의 뉴클레오티드 서열과 적어도 95%, 예컨대 적어도 97%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0255] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 200의 뉴클레오티드 서열과 적어도 50%, 예컨대 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도

76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0256] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 203의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 50%, 예컨대 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0257] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 201 또는 205에서 발견되는 오픈 리딩 프레임(ORF)에 의해 정의되거나 이중상동성인 유전자를 포함한다.

[0258] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 201 또는 205의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 50%, 예컨대 적어도 55%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 201 또는 205의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 60%, 예컨대 적어도 65%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 201 또는 205의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 201 또는 205의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 201 또는 205의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 90%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0259] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 201의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 50%, 예컨대 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0260] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 서열번호 205의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 50%, 예컨대 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0261] 일부 실시양태에 따르면, 상기 제1 EPS 유전자 클러스터 내 적어도 하나의 유전자는, 예를 들어, 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된다.

[0262] 일부 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 유전자는 *epsD*, *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsB*, *epsL*, *epsH*, *epsI*, *epsJ* 및 *epsS* 또는 이들의 오솔로그에서 선택된다.

[0263] 일부 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 유전자는 *epsD*, *epsE*, *epsF* 및 *epsG* 또는 이의 오솔로그에서 선택된다.

[0264] 일부 실시양태에 따르면, 유전자 *epsD*, *epsE*, *epsF* 및 *epsG* 또는 이들의 오솔로그는, 예를 들어, 유전자 서열의 일부 결실 또는 전체 결실에 의해 불활성화된다.

[0265] 일부 실시양태에 따르면, 유전자 *epsD*는 서열번호 32와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는

적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하고, 유전자 *epsG*는 서열번호 71과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화한다.

- [0274] 일부 실시양태에 따르면, 유전자 *epsD*는 서열번호 154와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 유전자 *epsE*는 서열번호 155와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 유전자 *epsF*는 서열번호 156과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 유전자 *epsG*는 서열번호 157과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0275] 일부 실시양태에 따르면, 유전자 *epsD*는 서열번호 154와 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 유전자 *epsE*는 서열번호 155와 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 유전자 *epsF*는 서열번호 156과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 유전자 *epsG*는 서열번호 157과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0276] 일부 실시양태에 따르면, 유전자 *epsD*는 서열번호 154와 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 유전자 *epsE*는 서열번호 155와 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 유전자 *epsF*는 서열번호 156과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 유전자 *epsG*는 서열번호 157과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0277] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 제1 EPS 유전자 클러스터를 불활성화하도록 변형되었다.
- [0278] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 제2 EPS 유전자 클러스터를 불활성화하도록 (추가로) 변형되었다.
- [0279] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 제1 EPS 유전자 클러스터 및 제2 EPS 유전자 클러스터를 불활성화하도록 변형되었다.
- [0280] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 상기 클러스터의 일부 또는 전체 서열 결실에 의해 불활성화된다.
- [0281] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 상기 클러스터의 전체 암호화 서열 결실에 의해 불활성화된다.
- [0282] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 상기 클러스터의 전체 서열 결실에 의해 불활성화된다.
- [0283] 일부 실시양태에 따르면, 제1 EPS 유전자 클러스터는 프로모터 및/또는 리보솜 결합 부위 영역의 변형에 의해 (예를 들어, 적어도 하나의 돌연변이를 도입함으로써) 불활성화되어 유전자 발현이 결여된다.
- [0284] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 상기 클러스터의 서열의 일부 또는 전체 서열 결실에 의해 불활성화된다.
- [0285] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 상기 클러스터의 전체 암호화 서열 결실에 의해 불활성화된다.
- [0286] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 상기 클러스터의 전체 서열 결실에 의해 불활성화된다.
- [0287] 일부 실시양태에 따르면, 제2 EPS 유전자 클러스터는 프로모터 및/또는 리보솜 결합 부위 영역의 변형에 의해 (예를 들어, 적어도 하나의 돌연변이를 도입함으로써) 불활성화되어 유전자 발현이 결여된다.
- [0288] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 서열번호 207 또는 209와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 서열번호 207 또는 209와 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 서열번호 207 또는 209와 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열이 결실되도록 변형되었다.

- [0289] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 서열번호 208 또는 210과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 서열번호 208 또는 210과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 유전자 조작된 박테리아는 서열번호 208 또는 210과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다.
- [0290] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 서열번호 207과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되고 서열번호 208과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 서열번호 207과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되고 서열번호 208과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 서열번호 207과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되고 서열번호 208과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다.
- [0291] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 서열번호 209와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되고 서열번호 210과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 서열번호 209와 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되고 서열번호 210과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 서열번호 209와 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되고 서열번호 210과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열이 결실되도록 변형되었다.
- [0292] 본 발명의 방법
- [0293] 본 발명은 적합한 배양 조건 하에서 본 발명에 따른 박테리아를 배양하는 것을 포함하는, 생화학 화합물을 생산하는 방법도 제공한다. 본 방법은 배양 배지로부터 생화학 화합물을 수집하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0294] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명은 GABA 또는 이의 유도체를 생산하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 GABA 또는 이의 유도체를 생산하는 방법을 제공하고; 상기 방법은 배양 배지에서 본 발명에 따른 박테리아를 배양하는 것을 포함한다. 본 방법은 배양 배지로부터 GABA 또는 이의 유도체를 수집하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, GABA 유도체는 2-피롤리돈, N-메틸-2-피롤리돈 및 폴리부티로락탐으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0295] 사용되는 배양 배지는 해당 박테리아 세포를 배양하는 데 적합한 임의의 통상적인 배지일 수 있으며, 선행 기술의 원리에 따라 구성될 수 있다. 배지는 보통 탄소원, 질소원 및 다른 무기염과 같이 각각의 박테리아의 성장과 생존에 필요한 모든 영양소를 함유할 것이다. 적합한 배지, 예를 들어, 최소 또는 복합 배지는 공급업체로부터 이용 가능하거나 발행된 리시트(receipts), 예를 들어, 균주의 ATCC(American Type Culture Collection) 카탈로그에 따라 제조될 수 있다. 당업자에게 잘 알려진 비제한적 표준 배지에는 Luria Bertani(LB) 브로스, Sabouraud Dextrose(SD) 브로스, MS 브로스, Yeast Peptone Dextrose, BMMY, GMMY 또는 Yeast Malt Extract(YM) 브로스가 포함되며, 이들은 모두 상업적으로 이용 가능하다. Luria Broth(LB), M9 배지, M17 배지, SA 배지, MOPS 배지, Terrific Broth, YT 등과 같은 최소 배지 및 풍부 배지를 포함한, 대장균 세포와 같은 박테리아 세포를 배양하기 위한 적합한 배지의 비제한적인 예.
- [0296] 탄소원은 당업계에 공지된 임의의 적합한 탄소 기질일 수 있으며, 특히 박테리아 배양 및/또는 발효에 통상 사용되는 임의의 탄소 기질일 수 있다. 적합한 발효성 탄소 기질의 비제한적인 예에는 탄수화물(예를 들어, 아라비노스 또는 자일로스와 같은 C5 당, 또는 글루코스와 같은 C6 당), 글리세롤, 글리세린, 아세테이트, 디하이드록시아세톤, 1-탄소원, 메탄올, 메탄, 오일, 동물성 지방, 동물성 오일, 식물성 오일, 지방산, 지질, 인지질, 글리세로지질, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드, 재생 가능한 탄소원, 폴리펩티드(예를 들어, 미생물, 또는 식물 단백질 또는 펩티드), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 펩톤, 카사미노산(casaminoacid) 또는 전술한 것 중 둘 이상의 임의의 조합이 포함된다.
- [0297] 일부 실시양태에 따르면, 탄소 기질은 C5 당(예컨대 아라비노스 또는 자일로스), C6 당(예컨대 글루코스 또는

프럭토스), 락토스, 수크로스, 글리세롤, 글리세린, 아세테이트, 옥수수 침지액(Corn steep liquor), 효모 추출물, 효모 추출물로부터의 성분, 펩톤, 카사미노산 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0298] 본 발명의 박테리아가 메틸이용성 박테리아인 경우, 배양 배지는 바람직하게는 메탄올 또는 메틸아민과 같은 환원된 1-탄소 화합물, 또는 디메틸아민과 같이 탄소-탄소 결합을 함유하지 않는 다중 탄소 화합물을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 배양 배지는 탄소원으로서 메탄올을 포함한다. 배양 배지 중 메탄올의 농도는 일반적으로 약 0.5% w/v 내지 약 4% w/v, 예컨대 약 2% w/v 내지 약 4% w/v 범위일 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, 배양 배지 중 메탄올의 농도는 약 2.5% w/v 내지 약 3.5% w/v 범위이다.

[0299] 질소원으로서 암모니아 및 황산암모늄과 같은 다양한 암모늄염, 아민과 같은 다른 질소 화합물, 펩톤과 같은 천연 질소원, 대두 가수분해물 및 분해된 발효성 미생물을 사용할 수 있다. 미네랄로서 일인산칼륨, 황산마그네슘, 염화나트륨, 황산제1철, 황산망간, 염화칼슘 등을 사용할 수 있다.

[0300] 적합하게는, 박테리아는 원하는 생성물의 생산에 적합한 조건 하에서 배양된다. 각각의 박테리아를 배양하기 위한 적합한 조건은 당업자에게 잘 알려져 있다. 전형적으로, 박테리아는 약 20 내지 약 45℃ 범위, 예컨대 약 30 내지 약 38℃ 범위, 예컨대 약 37℃의 온도에서 배양된다. 배양은 바람직하게는 예컨대 진탕 배양에 의해, 교반 배양에 의해 또는 폭기 기능이 있는 생물반응기(bioreactor with aeration)에서 호기성 조건 하에 약 20 내지 약 45℃, 예컨대 약 30 내지 38℃, 바람직하게는 약 37℃에서 수행될 수 있다. 배양물의 pH는 보통 5 초과, 예컨대 약 6 내지 약 8 범위, 바람직하게는 약 6.5 내지 약 7.5 범위, 더욱 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.2 범위이다. 배양물의 pH는 암모니아, 탄산칼슘, 다양한 산, 다양한 염기 및 버퍼를 사용하여 조정할 수 있다. 배양은 10 내지 70시간 범위, 바람직하게는 24 내지 60시간 범위, 더 바람직하게는 36 내지 50시간 범위의 기간 동안 수행될 수 있다.

[0301] 배양 후, 세포와 같은 고형물은 원심분리 또는 막 여과를 통해 배양 배지에서 제거될 수 있다. 생화학 화합물은 배지로부터 화학 화합물을 분리하고 정제하는 통상적인 방법에 의해 수집될 수 있다. 잘 알려진 정제 절차에는 원심분리 또는 여과, 침전, 이온 교환, 크로마토그래피 방법, 예컨대 이온 교환 크로마토그래피 또는 겔 여과 크로마토그래피, 및 결정화 방법이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 본 방법은 배양 배지로부터 생화학 화합물을 수집하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0302] 본 발명의 방법에 의해 생산되는 생화학 화합물은 본 발명의 박테리아의 배양을 통해 얻는 임의의 원하는 화합물일 수 있다. 비제한적인 예에는 유기산, 아미노산, 지방산 및 이들의 유도체가 포함된다. 유기산의 비제한적인 예에는 푸마레이트, 글리콜레이트, 석시네이트, 말레이트, 말로네이트, 락테이트 및 이들의 유도체가 포함된다. 아미노산의 비제한적인 예에는 글루타메이트, 라이신, 메티오닌, 트립토판, 페닐알라닌 및 이들의 유도체가 포함된다.

[0303] 일반적으로, 생화학 화합물의 생산에 본 발명의 박테리아를 사용할 때, 박테리아는 상기 생화학 화합물을 생산하는 능력이 있을 것이다. 이는 박테리아가 배지에서 배양될 때 배양 배지에서 또는 박테리아에서 박테리아가 관심 생화학 화합물을 생산, 배설 또는 분비할 수 있고/거나 축적을 유발할 수 있음을 의미한다. 박테리아가 생화학 화합물을 생성하는 생합성 경로에 관련된 모든 효소를 발현하는 경우 해당 생화학 화합물을 생산할 수 있는 능력이 있는 것으로 간주한다. 박테리아는 본질적으로 관심 생화학 화합물을 생성하는 능력이 있을 수 있거나, 예를 들어, DNA 재조합 기술을 사용하여 관심 생화학 화합물을 생성하는 능력이 있도록 변형될 수 있다. 후자의 경우, 박테리아는 생화학 화합물의 생합성에 필요한 효소(들)를 이중 발현하도록 유전적으로 변형될 것이다.

[0304] 예를 들어, 생산될 생화학 화합물이 GABA 또는 이의 유도체인 경우 박테리아는 GABA를 생산하는 능력이 있을 것이다. 박테리아가 GABA 또는 이의 유도체를 생산하는 생합성 경로에 관련된 모든 효소를 발현하는 경우, 박테리아는 GABA 또는 이의 유도체를 생산하는 능력이 있는 것으로 간주한다.

[0305] GABA를 생산하기 위해, 대부분의 GABA 생산 박테리아는 CO₂ 제거를 통해 글루타메이트를 GABA로 전환하는 글루타메이트 데카복실라제(glutamate decarboxylase, GAD) 효소를 사용한다. 따라서, GABA를 생산하는 능력이 있는 박테리아는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드(EC 4.1.1.15; 유전자 *gadA* 또는 *gadB*, 또는 이의 오솔로그에 의해 암호화됨)를 적절하게 포함(예를 들어, 발현)한다. 박테리아는 본질적으로 GABA 또는 이의 유도체를 생산하는 능력이 있을 수 있거나, 예를 들어, DNA 재조합 기술을 사용하여 GABA 또는 이의 유도체를 생산하는 능력이 있도록 변형될 수 있다. 후자의 경우, 박테리아는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드를 이중 발현하도록 유전적으로 변형될 것이다.

- [0306] 본원에서 사용되는 "글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드" 또는 "글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성을 갖는 폴리펩티드"는 다음 반응을 촉매하는 폴리펩티드를 의미한다: L-글루타메이트 $\rightleftharpoons$ 4-아미노부타노에이트 + CO(2) (EC 4.1.1.15). 이러한 폴리펩티드의 비제한적 예는 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 97%의 서열 동일성을 갖는 서열번호 211 내지 220 및 이들의 변이체에 제공된다.
- [0307] 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드를 발현한다.
- [0308] 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드를 발현하며, 이는 서열번호 211 내지 220에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드를 발현하며, 이는 서열번호 211 내지 220에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드를 발현하며, 이는 서열번호 211 내지 220에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0309] 박테리아에서는 GAD 효소가 산성 스트레스 반응에 참여한다. 일부 박테리아가 낮은 pH에 노출되면 gad 유전자 발현이 증가한다. 이는 글루타메이트의 급속한 탈카복실화를 초래하여 세포내 양성자를 소비하고 pH를 증가시킨다. 이 과정에서 GABA가 생산된다. GAD 활성은 산성 환경에서 필요하므로 pH 4.0-5.0에서 최적의 활성을 나타내지만 중성 pH 7.0에서는 불활성화된다. 세포질의 정상적인 생리학적 조건, 특히 중성 pH에서 GAD 활성이 결여되면 중성 pH에서 지속적인 GABA 생산이 방지된다.
- [0310] 따라서, 본 발명은 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 야생형 폴리펩티드(즉, 유기체에서 자연적으로 발견되는 글루타메이트 데카복실라제)를 사용하는 것을 고려하지만, 돌연변이 GAD 효소, 특히 pH 6 내지 pH 8 범위에서 촉매 활성이 있는 효소를 사용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0311] GAD 효소의 pH 범위를 개선하기 위해 두 가지 접근법이 사용되었다. 한 가지 방법은 환경 pH가 중성일 때 GAD의 촉매 부위를 물리적으로 차단하는, GAD의 C 말단 부분을 제거하는 것이다. 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) GAD 효소의 C 말단을 절단함으로써, 효소의 pH 범위가 4.0-8.0으로 확장되었다(Yu 등, 2012). 두 번째 접근법에서는 무작위 돌연변이 유발을 통해 GAD 효소의 특정 부위를 돌연변이시켜 중성 pH에서 활성인 돌연변이 효소를 얻었다. 대장균 GAD(H465)의 끝에서 두 번째 His 잔기를 돌연변이시키므로써 C 말단은 다시 중성 pH에서 GAD 활성을 차단할 수 없었다(Pennacchietti, 등, 2009). 대장균 GAD의 E89Q 돌연변이는 중성 pH에서 활성 손실도 방지한다(Thu Ho 등, 2013). 4개의 아미노산 변화(T17I, D294G, E312S, Q346H)가 도입된 락토바실러스 브레비스 GAD에서 유사한 효과가 관찰되었다.
- [0312] 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 박테리아는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있고 pH 6 내지 pH 8 범위, 더욱 바람직하게는 pH 7.0에서 촉매 활성을 나타내는 폴리펩티드를 발현한다.
- [0313] 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 이것이 유래된 야생형 GAD 효소와 비교하여 이의 아미노산 서열에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 GAD 돌연변이체로서, pH 6 - pH 8의 범위의 pH에서 활성화된다.
- [0314] 일부 실시양태에 따르면, 적어도 하나의 아미노산 치환은 서열번호 211의 89 위치 및/또는 465 위치에 해당하는 위치에 있다. 따라서, 일부 실시양태에 따르면, GAD 돌연변이체는 이의 아미노산 서열에 서열번호 211의 89 위치에 해당하는 위치의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, GAD 돌연변이체는 이의 아미노산 서열에 서열번호 211의 465 위치에 해당하는 위치의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, GAD 돌연변이체는 이의 아미노산 서열에 서열번호 211의 89 위치 및 465 위치에 해당하는 위치의 2개의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0315] 일부 실시양태에 따르면, 폴리펩티드는 이것이 유래된 야생형 GAD 효소와 비교하여 C 말단에서 결실된 2 내지 20개의 아미노산, 예컨대 2 내지 14개의 아미노산을 갖는 GAD 돌연변이체이다.
- [0316] 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 다음 중 어느 하나에서 선

택된다:

- [0317] a) 서열번호 211과 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 211의 89 위치 및/또는 465 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0318] b) 서열번호 212와 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 212의 84 위치 및/또는 457 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0319] c) 서열번호 213과 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 213의 93 위치 및/또는 467 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0320] d) 서열번호 214와 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 214의 90 위치 및/또는 467 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0321] e) 서열번호 215와 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 215의 85 위치 및/또는 462 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0322] f) 서열번호 216과 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 216의 89 위치 및/또는 465 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0323] g) 서열번호 217과 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 217의 89 위치 및/또는 466 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0324] h) 서열번호 218과 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 218의 89 위치 및/또는 466 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0325] i) 서열번호 219와 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 219의 89 위치 및/또는 463 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드;
- [0326] j) 서열번호 220과 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 220의 17 위치, 91 위치, 94 위치, 213 위치, 346 위치 및/또는 468 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드; 및
- [0327] k) 2 내지 20개의 아미노산, 예컨대 2 내지 14개의 아미노산이 C 말단에서 결실되어 있는, 서열번호 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 또는 220과 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드.
- [0328] 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 211과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 211의 89 위치 및/또는 465 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 211과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 211의 89 위치 및/또는 465 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 211과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖고 서열번호 211의 89 위치 및/또는 465 위치에 해당하는 위치에 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0329] 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 212와 적어도

- [0341] 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 221과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 89 위치의 아미노산은 E가 아니고, 바람직하게는 89 위치의 아미노산은 Q이다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 221과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 89 위치의 아미노산은 E가 아니고, 바람직하게는 89 위치의 아미노산은 Q이다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD)를 갖는 폴리펩티드는 서열번호 221과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 89 위치의 아미노산은 E가 아니고, 바람직하게는 89 위치의 아미노산은 Q이다.
- [0342] 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 223과 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 84 위치의 아미노산은 E가 아니고, 바람직하게는 84 위치의 아미노산은 Q이다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 223과 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 84 위치의 아미노산은 E가 아니고, 바람직하게는 84 위치의 아미노산은 Q이다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 223과 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 84 위치의 아미노산은 E가 아니고, 바람직하게는 84 위치의 아미노산은 Q이다.
- [0343] 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 225와 적어도 70%, 예컨대 적어도 75%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 17 위치의 아미노산은 T가 아니고/거나 294 위치의 아미노산은 D가 아니고/거나 312 위치의 아미노산은 E가 아니고/거나 346 위치의 아미노산은 Q가 아니고, 바람직하게는 17 위치의 아미노산은 I이고/거나 294 위치의 아미노산은 G이고/거나 312 위치의 아미노산은 S이고/거나 346 위치의 아미노산은 H이다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 225와 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 17 위치의 아미노산은 T가 아니고/거나 294 위치의 아미노산은 D가 아니고/거나 213 위치의 아미노산은 E가 아니고/거나 346 위치의 아미노산은 Q가 아니고, 바람직하게는 17 위치의 아미노산은 I이고/거나 294 위치의 아미노산은 G이고/거나 312 위치의 아미노산은 S이고/거나 346 위치의 아미노산은 H이다. 일부 실시양태에 따르면, 글루타메이트 데카복실라제(GAD) 활성이 있는 폴리펩티드는 서열번호 225와 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 17 위치의 아미노산은 T가 아니고/거나 294 위치의 아미노산은 D가 아니고/거나 312 위치의 아미노산은 E가 아니고/거나 346 위치의 아미노산은 Q가 아니고, 바람직하게는 17 위치의 아미노산은 I이고/거나 294 위치의 아미노산은 G이고/거나 312 위치의 아미노산은 S이고/거나 346 위치의 아미노산은 H이다.
- [0344] GABA와 같은 생화학 화합물의 생합성에 필요한 효소(들)의 이중 발현을 달성하기 위해, 상기 효소(들)를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 외인성 핵산 분자가 박테리아에 도입되었다. 따라서, 유전자 변형된 박테리아는 해당 상기 효소(들)를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나 이상의 외인성 핵산 분자를 포함할 수 있다. 박테리아에서 상기 효소(들)의 발현을 촉진하기 위해, 외인성 핵산 분자(들)는 박테리아 세포에서 mRNA 분자 생산을 유발하는 기능이 있고 상기 효소(들)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열(들)에 작동 가능하게 연결된 적절한 조절 요소, 예컨대 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0345] DNA 분자와 같은 외인성 핵산 분자를 박테리아 세포 내로 도입하는 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 특히 형질전환(예를 들어, 열 충격 또는 자연 형질전환)을 포함한다.
- [0346] 적합하게는, 외인성 핵산 분자는 박테리아에서 mRNA 분자 생산을 유발하는 기능이 있고 해당 상기 효소(들)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 및 전사 종결자 서열을 5'에서 3'로 포함하는 적어도 하나의 전사 단위를 포함한다.
- [0347] 본 발명에 따른 유용한 프로모터는 주어진 숙주 세포에서 mRNA 분자 생산을 유발하는 기능이 있는 임의의 공지된 프로모터이다. 많은 이러한 프로모터가 당업자에게 알려져 있다. 이러한 프로모터에는 보통은 다른 유전자와 연관된 프로모터 및/또는 임의의 박테리아로부터 단리된 프로모터가 포함된다. 단백질 발현을 위한 프로모터의 사용은 일반적으로 분자 생물학 분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, Sambrook 등, Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989를 참고한다. 사용되는 프로모터는 온도 유도성 프로모터(예를 들어, 각각 온도 민감성 람다 억제인자 (temperature-sensitive lambda repressor) c1857에 의해 제어될 수 있는 pL 또는 pR 파지 람다 프로모터)와

같이 유도성일 수 있다. 프로모터와 관련하여 사용되는 용어 "유도성"은 온도 변화 또는 화학 물질("화학 유도제")의 존재와 같은 자극이 존재하는 경우 프로모터가 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열의 전사만을 지시한다는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는, 본 발명에 따른 "화학 유도"는 외인성 또는 내인성 물질(거대분자, 예를 들어, 단백질 또는 핵산 포함)을 숙주 세포에 물리적으로 적용하는 것을 의미한다. 이는 숙주 세포에 존재하는 표적 프로모터가 전사 속도를 증가시키는 효과가 있다. 대안적으로, 사용되는 프로모터는 상시발현(constitutive) 프로모터일 수 있다. 프로모터와 관련하여 사용되는 용어 "상시발현"은 프로모터가 자극(예컨대 열 충격, 화학물질 등) 없이 작동 가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열의 전사를 지시할 수 있음을 의미한다.

[0348] 예를 들어, 온도 유도 시스템은 열불안정성 억제인자에 의해 억제되는 프로모터를 사용하여 작동한다. 이러한 억제인자는 저온, 예를 들어, 30℃에서 활성화되는 반면, 37℃에서는 올바르게 접힐 수 없으므로 불활성화된다. 따라서, 이러한 회로는 억제인자와 함께 유전자의 게놈 통합을 통해 관심 유전자를 직접 조절하는 데 사용될 수 있다(St-Pierre 등 2013). 온도 유도성 발현 시스템과 같은 예는 열불안정성 cI857 억제인자에 의해 조절되는 pL 및/또는 pR λ 파지 프로모터에 기초한다. 게놈 통합 DE3 시스템과 유사하게, T7 RNA 폴리머라제 유전자의 발현도 온도 제어 프로모터 시스템을 사용하여 제어될 수 있는 반면(Mertens 등 1995), 관심 유전자의 발현은 T7 프로모터를 사용하여 제어될 수 있다.

[0349] 박테리아에서 기능적인 프로모터의 비제한적 예에는 T7 프로모터, 베타-락타마제(beta-lactamase) 및 락토스 프로모터 시스템과 같은 상시발현 프로모터 및 유도성 프로모터 둘다; 알칼리성 포스파타제(phoA) 프로모터, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 테트라사이클린 프로모터(tetracycline promoter), 람다-파지 프로모터(lambda-phage promoter), 리보솜 단백질 프로모터(ribosomal protein promoter); 및 tac 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터가 포함된다. 다른 박테리아 및 합성 프로모터도 적합하다.

[0350] 프로모터 외에, 외인성 핵산 분자는 5' 비번역 영역(5' untranslated region, 5' UTR) 및 3' 비번역 영역(3' UTR)에서 선택된 적어도 하나의 조절 요소를 추가로 포함할 수 있다. 원핵생물 및 진핵생물에서 유래된 이러한 많은 5' UTR 및 3' UTR이 당업자에게 잘 알려져 있다. 이러한 조절 요소에는 보통은 다른 유전자와 연관된 5' UTR 및 3' UTR 및/또는 임의의 박테리아에서 단리된 5' UTR 및 3' UTR이 포함된다.

[0351] 보통 5' UTR은 개시 코돈에서 보통 3-10개의 염기쌍 업스트림에 있는, Shine Dalgarno 서열이라고도 알려진 리보솜 결합 부위(RBS)를 함유한다.

[0352] 외인성 핵산 분자는 발현 카세트 또는 벡터와 같은 DNA 작제물일 수 있다. 따라서, 외인성 핵산 분자는 발현 벡터와 같은 벡터, 또는 이러한 벡터에 포함된 발현 카세트와 같은 벡터의 일부일 수 있다. 보통은 이러한 벡터는 박테리아 세포 내 염색체 외(extrachromosomal)로 남아 있으며 이는 박테리아 세포의 게놈 외부에서 발견된다는 의미이다. 대안적으로, 외인성 핵산 분자는 (예를 들어, 무작위 또는 표적 삽입에 의해) 박테리아의 게놈에 안정하게 통합될 수 있다. 특히, 외인성 핵산 분자는 (예를 들어, 무작위 또는 표적 삽입에 의해) 박테리아의 게놈에 안정적으로 통합된 발현 카세트일 수 있다.

[0353] 본 발명은 상술한 방법에 의해 얻을 수 있는 생화학 화합물도 제공한다.

[0354] 본 발명은 적합한 배양 조건 하에서 본 발명에 따른 박테리아를 배양하는 것을 포함하는 바이오매스 생산 방법도 제공한다.

[0355] 배양 배지, 온도 등과 같은 배양 조건에 관한 세부사항은 생화학물질의 생산 방법과 관련하여 위에서 제시되었으며, 이를 적절하게 수정하여 적용한다.

[0356] 특정 다른 정의

[0357] 본원에서 사용되는 "생화학 화합물"은 살아있는 유기체에 의해 생산되는 임의의 탄소 기반 화합물을 의미한다.

[0358] 박테리아와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "중온성"은 박테리아가 최적 성장 범위인 20 내지 45℃의 중간 온도에서 가장 잘 성장한다는 것을 의미한다.

[0359] 박테리아와 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "메틸이용성"은 박테리아가 성장을 위한 탄소원으로서 메탄올, 메탄, 포르메이트 또는 메틸아민과 같은 환원된 1-탄소 화합물, 및 디메틸 에테르 및 디메틸아민과 같이 탄소-탄소 결합을 함유하지 않는 다중 탄소 화합물을 사용할 수 있음을 의미한다.

[0360] "폴리펩티드" 및 "단백질"은 길이 또는 번역 후 변형(예를 들어, 글리코실화(glycosylation), 인산화

(phosphorylation), 지질화(lipidation), 미리스토일화(myristoylation), 유비퀴틴화(ubiquitination) 등)에 관계없이 아미드 결합에 의해 공유 연결된 적어도 2개의 아미노산의 중합체를 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이 정의에는 D-아미노산, L-아미노산, 및 D-아미노산과 L-아미노산의 혼합물이 포함된다.

[0361] "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 길이 또는 염기 변형에 관계없이 포스포디에스테르 결합에 의해 공유 연결된 적어도 2개의 핵산 단량체 단위 또는 염기(예를 들어, 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민)의 중합체를 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0362] 예를 들어, 숙주 세포, 핵산 또는 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때 "재조합" 또는 "비자연 발생"은 자연에 존재하지 않는 방식으로 변형되었거나 동일하지만 합성 물질로부터 및/또는 재조합 기술을 사용한 조작에 의해 생산되거나 유래된 물질, 또는 이 물질의 자연 또는 천연 형태에 해당하는 물질을 지칭한다. 비제한적인 예로는 특히 세포의 천연(비재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 상이한 수준으로 발현되는 천연 유전자를 발현하는 재조합 박테리아 세포가 포함된다.

[0363] 유전자 또는 핵산 분자와 관련하여 본원에서 사용되는 "이종" 또는 "외인성"은 박테리아 게놈의 일부로서 자연적으로 발생하지 않는 유전자 또는 핵산 분자(즉, DNA 또는 RNA 분자)를 지칭하며 이는 자연에서 발생하는 것과 상이한 게놈의 위치에 존재하거나 발견된다. 따라서, "이종" 또는 "외인성" 유전자 또는 핵산 분자는 박테리아에 내인성이 아니며 미생물에 외인성으로 도입되었다. "이종" 유전자 또는 핵산 분자 DNA 분자는 숙주 DNA로서 상이한 유기체, 상이한 종, 상이한 속 또는 상이한 계(kingdom)에서 유래할 수 있다.

[0364] 폴리펩티드와 관련하여 본원에서 사용되는 "이종"은 폴리펩티드가 보통은 숙주 미생물에서 발견되지 않거나 만 들어지지 않고(즉, 발현되지 않고) 상이한 유기체, 상이한 종, 상이한 속 또는 상이한 계에서 유래됨을 의미한다.

[0365] 본원에서 사용되는 용어 "오솔로그" 또는 "오솔로그들"은 공통 조상 유전자에서 유래되었지만 상이한 종에 존재하는 유전자, 이에 의해 암호화된 핵산 분자, 즉 mRNA, 또는 이에 의해 암호화된 단백질을 지칭한다.

[0366] 유전자의 "감소된 발현"이란 전사 생성물의 양, 각각 변형된 박테리아에 의해 생산된 상기 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드(예를 들어, 효소)의 양이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 감소함을 의미한다. 더 구체적으로, 유전자의 "감소된 발현"이란 변형된 박테리아에 의해 생산된 상기 유전자에 의해 암호화된 전사 생성물의 양, 각각 폴리펩티드(예를 들어, 효소)의 양이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아와 비교하여 적어도 10%, 예컨대 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 100% 감소함을 의미한다. 유전자의 발현 수준은 PCR, 서던 블롯팅(Southern blotting) 등을 포함한 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 또한, 유전자의 발현 수준은 노던 블롯팅(Northern blotting), 정량적 RT-PCR 등을 포함한 널리 알려진 다양한 방법을 사용하여 유전자로부터 전사되는 mRNA의 양을 측정함으로써 추정할 수 있다. 유전자에 의해 암호화되는 폴리펩티드의 양은 ELISA, 면역조직화학(Immunohistochemistry) 또는 웨스턴 블롯팅(Western Blotting) 등을 포함한 공지된 방법으로 측정할 수 있다.

[0367] 유전자의 발현은 박테리아 게놈의 유전자에 돌연변이를 도입하여 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드의 세포내 활성이 상기 돌연변이를 가지고 있지 않은 동일한 박테리아와 비교하여 감소하도록 함으로써 감소될 수 있다. 유전자의 발현 감소를 초래하는 돌연변이에는 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드에서 아미노산 치환을 야기하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 교체(미스센스 돌연변이), 정지 코돈의 도입(넌센스 돌연변이), 프레임 이동, 약물 내성 유전자의 삽입 또는 유전자의 일부 또는 유전자 전체 결실을 유발하는 뉴클레오타이드의 결실 또는 삽입이 포함된다(Qiu 및 Goodman, 1997; Kwon 등, 2000). 발현은 프로모터, Shine-Dalgarno(SD) 서열 등과 같은 발현 조절 서열을 변형함으로써도 감소될 수 있다. 유전자의 발현은 "람다-레드 매개 유전자 대체(lambda-red mediated gene replacement)"와 같은 유전자 대체에 의해서도 감소될 수 있다(Datsenko 및 Wanner, 2000). 람다-레드 매개 유전자 대체는 본원에 기술된 바와 같이 하나 이상의 유전자를 불활성화시키는 데 특히 적합한 방법이다.

[0368] 유전자 또는 유전자 클러스터와 관련하여 사용되는 경우 "불활성(Inactivating)", "불활성화(inactivation)" 및 "불활성화된(inactivated)"은 해당 유전자 또는 유전자 클러스터가 더 이상 기능성 단백질을 발현하지 않음을 의미한다. 유전자 또는 유전자 클러스터의 일부 또는 전체 서열 결실, 유전자 또는 유전자 클러스터의 리딩 프레임 이동, 미스센스/넌센스 돌연변이(들)의 도입, 또는 프로모터, 인핸서(enhancer), 감쇠자(attenuator), 리보솜 결합 부위 등과 같은 유전자 발현을 제어하는 서열을 포함하는 유전자 또는 유전자 클러스터의 조절 영역의 변형으로 인해 변형된 DNA 영역이 유전자 또는 유전자 클러스터를 자연적으로 발현하지 못할 가능성이 있다.

바람직하게는, 관심 유전자 또는 유전자 클러스터는 유전자 대체와 같은 유전자 또는 유전자 클러스터의 일부 또는 전체 서열 결실에 의해 불활성화된다. 또한, 불활성화는 관심 유전자 또는 유전자 클러스터를 DNA 절단, 바람직하게는 이중 가닥 절단에 의해 선택적으로 불활성화할 수 있는 회귀 절단 엔도뉴클레아제를 도입하거나 발현함으로써 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락 내에서 "회귀 절단 엔도뉴클레아제"는 전사 활성인자 유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 및 RNA 가이드 엔도뉴클레아제를 포함한다.

[0369] 박테리아 계통 내의 유전자 또는 유전자 클러스터의 존재 또는 부재는 PCR, 서던 블롯팅 등을 포함한 잘 알려진 방법에 의해 검출될 수 있다. 또한, 노던 블로팅, 정량적 RT-PCR 등을 포함한 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 유전자 또는 유전자 클러스터로부터 전사되는 mRNA의 양을 측정함으로써 유전자 발현 정도를 추정할 수 있다. 유전자 또는 유전자 클러스터에 의해 암호화된 폴리펩티드의 양은 SDS-PAGE에 이어 면역블롯팅 검정(웨스턴 블롯팅 분석) 등을 포함한 잘 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0370] 본원에서 사용되는, 폴리펩티드(예컨대 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드)의 "감소된" 또는 "감소하는" 발현, 또는 발현의 "감소"는 변형된 박테리아에서 상기 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아(대조군)에서 상기 폴리펩티드의 발현과 비교하여 감소됨을 의미한다. 변형된 박테리아에서 폴리펩티드의 발현은 해당 변형이 없는 동일한 박테리아(대조군)에서 상기 폴리펩티드의 발현과 비교하여 적어도 약 10%, 바람직하게는 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 100%, 또는 10%와 100% 사이의 전체 정수의 임의의 백분율(예를 들어, 6%, 7%, 8% 등) 만큼 감소될 수 있다. 더 구체적으로, 폴리펩티드의 "감소된" 또는 "감소하는" 발현, 또는 발현의 "감소"는 변형된 박테리아에서 폴리펩티드의 양이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아(대조군)에서 상기 폴리펩티드의 양과 비교하여 적어도 약 10%, 바람직하게는 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 100%, 또는 10%와 100% 사이의 전체 정수의 임의의 백분율(예를 들어, 6%, 7%, 8% 등) 만큼 감소됨을 의미한다. 박테리아에서 폴리펩티드의 발현 또는 양은 ELISA, 면역조직화학, 웨스턴 블롯팅 또는 유세포분석과 같은 기술을 포함한 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 결정될 수 있다.

[0371] 본원에서 사용되는, 폴리펩티드(예컨대 본원에 기술된 바와 같은 폴리펩티드)의 "제거된" 발현은 변형된 박테리아에서 상기 폴리펩티드의 발현이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아(대조군)에서 상기 폴리펩티드의 발현과 비교하여 검출 가능하지 않음을 의미한다.

[0372] 본원에서 사용되는, 폴리펩티드(예컨대 본원에 기술된 바와 같은 효소)의 "감소된" 또는 "감소하는" 활성, 또는 활성의 "감소"는 변형된 박테리아에서 상기 폴리펩티드의 촉매 활성이 해당 변형이 없는 동일한 박테리아(대조군)에서 상기 폴리펩티드의 촉매 활성과 비교하여 감소됨을 의미한다. 변형된 박테리아에서 폴리펩티드의 활성은 해당 변형이 없는 동일한 박테리아(대조군)에서 상기 폴리펩티드의 발현과 비교하여 적어도 약 10%, 바람직하게는 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 100%, 또는 10%와 100% 사이의 전체 정수의 임의의 백분율(예를 들어, 6%, 7%, 8% 등) 만큼 감소될 수 있다. 박테리아에서 폴리펩티드의 활성은 임의의 적합한 단백질 및 효소 활성 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0373] "발현"에는 전사, 전사 후 변형, 번역, 번역 후 변형 및 분비를 포함하지만 이에 제한되지 않는 폴리펩티드(예를 들어, 암호화된 효소)의 생산에 관련된 임의의 단계가 포함된다.

[0374] 본원에서 사용되는, 유전자 또는 유전자 클러스터의 "조절 영역"은 암호화 서열의 발현에 영향을 미치는 핵산 서열을 지칭한다. 조절 영역은 당업계에 공지되어 있으며, 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위, 매트릭스 부착 영역 및/또는 암호화 서열의 발현을 조절하는 다른 요소를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0375] "치환" 또는 "치환된"은 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 대체하는 폴리펩티드의 변형을 지칭하며, 예를 들어, 폴리펩티드 서열에서 세린 잔기를 글리신 또는 알라닌 잔기로 대체하는 것이 아미노산 치환이다. 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때, "치환" 또는 "치환된"은 하나의 뉴클레오티드를 다른 뉴클레오티드로 대체하는 폴리뉴클레오티드의 변형을 지칭하며, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 서열에서 시토신을 티민으로 대체하는 것이 뉴클레오티드 치환이다.

- [0376] 폴리펩티드와 관련하여 사용되는 경우 "보존 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 상이한 잔기로 치환하는 것을 지칭하며, 따라서 전형적으로 폴리펩티드의 아미노산을 동일한 또는 유사한 종류의 아미노산 내의 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 예를 들어, 제한 없이, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산은 다른 지방족 아미노산, 예를 들어, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신으로 치환될 수 있으며; 하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산은 하이드록실 측쇄를 갖는 다른 아미노산, 예를 들어, 세린 및 트레오닌으로 치환되고; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산은 방향족 측쇄를 갖는 다른 아미노산, 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 및 히스티딘으로 치환되고; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산은 염기성 측쇄를 갖는 다른 아미노산, 예를 들어, 리신 및 아르기닌으로 치환되고; 산성 측쇄를 갖는 아미노산은 산성 측쇄를 갖는 다른 아미노산, 예를 들어, 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환되고; 소수성 또는 친수성 아미노산은 각각 다른 소수성 또는 친수성 아미노산으로 대체된다.
- [0377] 폴리펩티드와 관련하여 사용되는 경우 "비보존 치환"은 폴리펩티드 내의 아미노산이 측쇄 특성이 상당히 다른 아미노산으로 치환되는 것을 지칭한다. 비보존 치환은 정의된 그룹 내보다는 정의된 그룹 사이의 아미노산을 사용할 수 있으며 (a) 치환 영역의 펩티드 백본 구조(예를 들어, 글리신의 경우 세린), (b) 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크에 영향을 준다. 예를 들어, 제한 없이, 예시적인 비보존 치환은 염기성 또는 지방족 아미노산으로 치환된 산성 아미노산; 작은 아미노산으로 치환된 방향족 아미노산; 및 소수성 아미노산으로 치환된 친수성 아미노산일 수 있다.
- [0378] 본원에서 사용되는 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산 분자를 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 유형은 추가 핵산 세그먼트가 결합될 수 있는 원형 이중 가닥 핵산 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 특정 다른 벡터는 외인성 핵산 분자가 박테리아 계놈에 삽입되는 것을 촉진할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "형질전환 벡터"로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 핵산 기술에 유용한 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드"와 "벡터"는 플라스미드가 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태이므로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 다수의 적합한 벡터가 당업자에게 알려져 있고 상업적으로 이용 가능하다.
- [0379] 본원에서 사용되는 "프로모터"는 보통 구조 유전자의 암호화 영역의 업스트림(5')인 DNA 서열을 지칭하며, 이는 RNA 폴리머라제 및 전사를 시작하려면 필요할 수 있는 다른 인자에 대한 인식 및 결합 부위를 제공함으로써 암호화 영역의 발현을 제어한다. 프로모터의 선택은 관심 핵산 서열에 따라 달라질 것이다. 적합한 "프로모터"는 일반적으로 본 발명의 박테리아에서 전사 개시를 지지하여 mRNA 분자를 생산할 수 있는 것이다.
- [0380] 본원에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된"은 기술된 구성요소가 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계에 있는 병치(juxtaposition)를 지칭한다. 암호화 서열에 "작동 가능하게 연결된" 제어 서열은 암호화 서열의 발현이 제어 서열과 적합한 조건 하에서 달성되는 방식으로 결합된다. 프로모터 서열은 유전자의 전사를 조절하기 위해 유전자의 전사 시작 부위에 충분히 근접하는 경우 유전자에 "작동 가능하게 연결"된다.
- [0381] "서열 동일성 백분율", "서열 동일성 %" 및 "동일성 백분율"은 뉴클레오타이드 서열과 기준 뉴클레오타이드 서열 사이 또는 아미노산 서열과 기준 아미노산 서열 사이의 서열 동일성을 지칭한다. 서열 동일성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각 서열의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교되는 서열의 위치가 동일한 염기나 아미노산으로 채워지면 분자는 해당 위치에서 동일하다. 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 정도는 각각 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열이 공유하는 위치에서 동일하거나 일치하는 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 수에 따라 달라진다. GCG 서열 분석 패키지(University of Wisconsin, Madison, WI)의 일부로 이용 가능하고 기본 설정으로 사용될 수 있는 FASTA 또는 BLAST를 포함한 다양한 정렬 알고리즘 및/또는 프로그램을 사용하여 두 서열 사이의 동일성을 계산할 수 있다.
- [0382] "기준 서열" 또는 "기준 아미노산 서열"은 다른 서열과 비교되는 정의된 서열을 지칭한다. 본 발명의 맥락에서 기준 아미노산 서열은, 예를 들어, 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열일 수 있다.
- [0383] 본원에서 사용되는 GABA의 "유도체"는 GABA로부터 변형되어 유래된 화합물을 지칭한다. GABA "유도체"의 비제한적인 예에는 2-피롤리돈, N-메틸-2-피롤리돈 및 폴리부티로락탐(나일론 4)이 포함된다.
- [0384] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 사용되는 수치값의 플러스 또는 마이너스 10%를 의미한다.
- [0385] 본원에서 수치 한계 또는 범위가 언급된 경우에는 엔드포인트가 포함된다. 또한, 수치 한계나 범위 내의 모든 값과 하위범위는 명시적으로 작성된 것처럼 구체적으로 포함된다.
- [0386] 본원에서 사용되는 부정관사 "a" 및 "an"은 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을

의미한다.

[0387] 본원에서 사용되는 용어 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "가지는(having)" 및 이들의 문법적 변형은 언급된 특징, 단계 또는 구성요소를 특정하는 것으로 간주해야 하지만 하나 이상의 추가 특징, 단계, 구성요소 또는 이의 그룹의 추가를 배제하지 않는다.

[0388] 본 발명을 일반적으로 설명하였지만, 본원에서는 단지 설명의 목적으로만 제공되고 달리 명시하지 않는 한 제한하려는 의도가 아닌 구체적인 특정 실시예를 참조하여 추가로 이해할 수 있다.

[0389] 실시예

[0390] **실시예 1:** 메틸로바실러스에서 폴리포스페이트 키나제(ppk) 유전자의 확인

[0391] 야생형 메틸로바실러스는 표준 바이오매스 공식에 따라 바이오매스 형성에 필요한 것보다 훨씬 더 많은 양의 포스페이트를 소비하는 것으로 밝혀졌다. 폴리포스페이트는 잠재적인 포스페이트 흡수원(sink)으로 확인되었고 세포내 폴리포스페이트 과립의 존재는 형광 현미경법과 DAPI 형광 염료를 사용한 폴리포스페이트 특이적 염색으로 확인하였다. 미생물에서 폴리P의 합성과 분해는 폴리포스페이트 키나제 효소(ppk)에 의해 촉매된다. 메틸로바실러스에서 폴립 형성을 담당하는 유전자를 확인하기 위해 대장균으로부터의 알려진 ppk 유전자 서열(서열번호 11)을 사용하여 메틸로바실러스 속으로부터의 모든 이용 가능한 게놈에 대한 BLAST 검색을 수행했는데, 이는 10 개의 히트(hit)를 생성하였다(데이터는 표시하지 않음). 메틸로박테리움 속에서도 동일한 작업을 반복하여 176 개의 히트가 생성되었다(데이터는 표시하지 않음). MAFT 알고리즘을 사용한 서열 정렬은 SnapGene 버전 6.0 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 활성 부위를 형성하는 잔기(Zhu 등 2005)와 대장균 효소의 폴리포스페이트 합성 활성에 필요한 잔기는 문헌(Tzeng 및 Kornberg, 2000)에서 확인하였다. 정렬을 통해 대장균 ppk1(서열번호 11) R375, S380A, F488A, P507A, R564A, R621A, Q674A에 해당하는 위치의 중요한 아미노산뿐만 아니라 대장균에 해당하는 활성 부위 아미노산(서열번호 11) 아미노산 H435 및 H592가 분석된 서열의 95% 초과에서 보존된 것으로 드러났다(데이터는 표시하지 않음).

[0392] **실시예 2:** 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 폴리포스페이트 키나제 유전자의 결실

[0393] 메틸로바실러스 플라젤라투스의 폴리포스페이트 키나제 유전자(서열번호 2)는 선택 마커 함유 DNA 작제물의 원래 ppk 유전자 좌위로의 상동 재조합에 의해 염색체에서 결실되었다. 간략하게, ppk 유전자 업스트림의 2000개의 염기쌍 서열 및 상기 유전자 다운스트림의 2000개의 염기쌍 서열을 PCR을 통해 게놈 DNA로부터 증폭시켰다. 단편은 자체 프로모터, 종결자 및 리보솜 결합 부위를 함유하는 항생제 내성 카세트에 첨부되었다. 생성된 선형 작제물은 전기천공법으로 메틸로바실러스 균주로 형질전환시켰다. 메탄올을 탄소원으로 하는 항생제 함유 최소 배지 한천 플레이트의 선택 단계를 사용하여 성공적인 형질전환체를 확인하였다. 올바른 좌위로의 DNA 통합은 콜로니 PCR로 확인하였다. 통합 후 전체 영역을 게놈으로부터 증폭시키고 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. 폴리포스페이트 유전자가 게놈에 존재하지 않도록 하기 위해 유전자를 특이적으로 표적으로 삼도록 PCR 프라이머 세트를 설계하였다. 증폭된 단편을 생성하지 않은 이러한 내부 프라이머를 사용한 콜로니 PCR은 ppk 유전자가 더 이상 존재하지 않는다는 추가 증거였다.

[0394] **실시예 3:** 메틸로바실러스 글리코게네스에서 폴리포스페이트 키나제 유전자의 결실:

[0395] 메틸로바실러스 글리코게네스(서열번호 4)의 폴리포스페이트 키나제 유전자는 선택 마커 함유 DNA 작제물의 원래 ppk 유전자 좌위로의 상동 재조합에 의해 염색체에서 결실되었다. 간략하게, ppk 유전자 업스트림의 2000개의 염기쌍 서열 및 유전자 다운스트림의 2000개의 염기쌍 서열을 PCR을 통해 게놈 DNA로부터 증폭시켰다. 단편은 자체 프로모터와 종결자를 포함하는 카나마이신(kanamycin) 내성 카세트에 부착되었으며 선형 구조는 전기천공법으로 메틸로바실러스 균주로 변형시켰다. 카나마이신 함유 최소 배지 한천 플레이트의 선택 단계를 사용하여 성공적인 형질전환체를 확인하였고 올바른 좌위로의 DNA 통합을 콜로니 PCR로 확인하였다. 통합 후 전체 영역을 게놈으로부터 증폭시키고 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. 폴리포스페이트 유전자가 게놈에 존재하지 않도록 하기 위해 ppk 유전자를 특이적으로 표적으로 삼도록 PCR 프라이머 세트를 설계하였다. 다른 증거와 함께 내부 프라이머를 활용한 음성 콜로니 PCR은 ppk 유전자가 더 이상 존재하지 않는다는 표시로 사용하였다.

[0396] **실시예 4:** WT 및 del-ppK 균주의 폴리P 과립 비교

[0397] ppK 유전자(서열번호 2)가 결실되거나 결실되지 않은 메틸로바실러스 플라젤라투스의 배양물을 최소 메탄올 배지 내 5리터 생물반응기 및 진탕 플라스크에서 배양하였다. 충분한 세포 밀도가 달성된 후(OD600 ~2), 각 배양물로부터의 샘플을 40마이크로몰의 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하였다. 염색 용액은 pH 7 포스페이

트 완충 식염수로 제조하였다. DAPI는 통상 DNA 염색에 사용되지만 샘플에 더 높은 농도(마이크로몰 범위)로 첨가하면 폴리포스페이트 과립을 염색하는 데에도 사용할 수 있다. 폴리포스페이트 과립에 결합되면 염료의 방출 스펙트럼은 파란색에서 노란색으로 더 긴 파장 쪽으로 스펙트럼이 이동하게 된다. 샘플은 자외선(405nm) 광으로 여기되었고 롱패스(long-pass) 430 방출 필터를 통해 관찰하였다. ppK 유전자를 발현하는 세포는 폴리포스페이트 과립을 함유하고 있는 반면, ppK 유전자가 결실된 세포는 과립을 함유하고 있지 않은 것으로 관찰되었다(도 1).

[0398] 실시예 5: ppK 파괴 유무에 따른 발효, 바이오매스 생산 비교

[0399] ppK 유전자가 있거나 없는 메틸로바실러스 플라젤라투스 균주를 사용하여 병렬 생물반응기 발효를 수행하였다. KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , NH_4SO_4 및 미량원소 혼합물을 함유하는 미네랄 배지를 사용하였다. 메탄올 농도는 온라인 독점 메탄올 센서를 사용하는 피드백 루프를 통해 발효 전반에 걸쳐 4-5g/L로 동적으로 유지하였다. 질소원으로도 사용되는 수산화암모늄을 자동으로 첨가하여 pH를 7로 유지하였다. 광학 밀도, CFU 수, 전체 브로스 건조 중량 및 유리 포스페이트와 같은 생물공정 매개변수를 정기적으로 측정하였다. 비-ppK 결실 생물공정에서 광학 밀도가 ~30에 도달할 때 신속한 세포 용해가 발생하였으며 광학 밀도의 저하, 콜로니 형성 단위(CFU)의 99% 감소 및 메탄올과 수산화암모늄의 공급 속도를 통해 관찰하였다. ppK 유전자가 존재하지 않는 경우, 광학 밀도는 ~45-50의 더 높은 값에 도달하였고, CFU는 정지기에 도달할 때 일정하게 유지되었으며 공급 속도의 급격한 감소가 관찰되지 않았는데, 이는 정지기 동안 세포가 대사적으로 활성 상태를 유지했음을 나타낸다. 정지기는 며칠 동안 유지될 수 있으며, 그 동안 생물물 합성이 발생할 수 있다(도 2).

[0400] 실시예 6: ppK 결실 유무에 따른 GABA 생산 비교

[0401] ppK 유전자가 있거나 없는 GABA 생산 메틸로바실러스 플라젤라투스를 사용하여 병렬 생물반응기 발효를 수행하였다. 균주에서 GABA 생산을 가능하게 하기 위해, 서열번호 221에 따른 단백질을 암호화하는 대장균(Eco GAD 돌연변이체 E89Q Δ C14)으로부터 글루타메이트 탈수소효소 효소를 발현시켰다(서열번호 222). 발현된 대장균 GAD 효소는 점 돌연변이 E89Q를 함유하였으며 최종 14개의 아미노산을 제거하여 C 말단에서 절단하였다. 이러한 변형은 천연 대장균 GAD 효소의 pH 의존성을 완화하고 중성 pH에서 GABA 합성을 가능하게 하기 위해 도입되었다. 유전자는 IPTG 유도성 lacO/trc 프로모터의 조절하에 플라스미드로부터 발현되었다.

[0402] KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , NH_4SO_4 및 미량원소 혼합물을 포함하는 미네랄 배지를 사용하였다. 메탄올 농도는 온라인 독점 메탄올 센서를 사용하는 피드백 루프를 통해 발효 전반에 걸쳐 4-5g/L로 동적으로 유지하였다. 질소원으로도 사용되는 수산화암모늄을 자동으로 첨가하여 pH를 7로 유지하였다. 두 생물반응기 모두의 샘플을 일정한 간격으로 채취하여 HPLC로 GABA 함량을 분석하였다. ppK 유전자가 존재하는 경우 배양이 ~30의 광학 밀도에 도달했을 때 세포 용해가 발생하였다. 이어서 발현된 GAD 효소가 다른 세포 내용물과 함께 발효액으로 방출됨에 따라 GABA 생산이 급증하였다. 이 초기 스파이크 이후에는 더 이상 GABA 생산이 감지되지 않았다. ppK 결실 균주의 경우, GABA 생산은 공정 전반에 걸쳐 일관되었으며 정지기 동안 축적되었다(도 3).

[0403] 실시예 7 - 아실-호모세린 락톤 합성효소의 생물정보학적 분석

[0404] 프로그램된 세포 사멸은 퀴럼 센싱 메커니즘과 연결되어 있다. 그람 음성 박테리아에서 퀴럼 센싱은 N-아실 호모세린 락톤 합성효소 효소에 의해 합성되는 N-아실 호모세린 락톤(AHL)에 따라 달라진다. 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 퀴럼 센싱 관련 유전자 클러스터의 존재를 검색하기 위해, 항SMASH 6.0(Blin 등, 2021) 알고리즘을 사용하여 전체 메틸로바실러스 플라젤라투스 게놈을 입력으로 사용하여 유전자 클러스터를 예측하였다(NCBI 수탁 번호: NC_007947.1). 알고리즘은 알려진 AHL 합성 기능이 있는 특성화된 유전자 클러스터를 분석된 게놈에 매핑하기 위해 시도하였다(도 4). 호모세린 락톤 합성효소 유전자(서열번호 14)를 포함하여 단일 호모세린 락톤 생산 클러스터(서열번호 227)를 확인하였다. 이어서, BLAST를 사용하여 메틸로바실러스 플라젤라투스, 메틸로바실러스 글리코게네스, 메틸로바실러스 리조스페레, 메틸로박테리움 오가노필룸, 메틸로러브룸 엑스토르켄스 및 메틸로러브룸 엑스토르켄스_AM1의 게놈에서 M. 플라젤라투스 효소의 동족체를 확인하였다(서열번호 13). 유기체에서 여러 후보 AHL 합성효소 단백질을 확인하였다(각각 서열번호 15, 17, 19, 21, 23 및 25).

[0405] 실시예 8 - M. 플라젤라투스에서 AHL 합성효소 유전자의 결실:

[0406] 메틸로바실러스 플라젤라투스의 AHL 합성효소 유전자(서열번호 14)를 선택 마커 함유 DNA 작제물의 원래 AHL 합성효소 유전자 좌위로의 상동 재조합에 의해 염색체에서 결실시켰다. 간략하게, AHL 합성효소 유전자 업스트림의 2000개의 염기쌍 서열 및 상기 유전자 다운스트림의 2000개의 염기쌍 서열을 PCR을 통해 게놈 DNA로부터 증

폭시켰다. 단편은 자체 프로모터, 종결자 및 리보솜 결합 부위를 함유하는 항생제 내성 카세트에 첨부되었다. 생성된 선형 작제물을 전기천공법으로 메틸로바실러스 플라젤라투스 균주로 형질전환시켰다. 메탄올을 탄소원으로 하는 항생제 함유 최소 배지 한천 플레이트의 선택 단계를 사용하여 성공적인 형질전환체를 확인하였다. 올바른 좌위로의 DNA 통합은 콜로니 PCR로 확인하였다. 통합 후 전체 영역을 게놈으로부터 증폭시키고 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. AHL 합성효소 유전자가 게놈에 존재하지 않도록 하기 위해 유전자를 특이적으로 표적으로 삼도록 PCR 프라이머 세트를 설계하였다. 증폭된 단편을 생성하지 않은 이러한 내부 프라이머를 사용한 콜로니 PCR은 AHL 합성효소 유전자가 더 이상 존재하지 않는다는 추가 증거였다.

[0407] **실시예 9 - 탄소 제한을 통한 AHL 합성효소 결실 유무에 따른 바이오매스 생산 비교**

[0408] AHL 합성효소 유전자(서열번호 14)가 있거나 없는 메틸로바실러스 플라젤라투스 균주를 사용하여 병렬 생물반응기 발효를 수행하였다. KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , NH_4SO_4 및 미량원소 혼합물을 포함하는 미네랄 배지를 사용하였다. 발효 전반에 걸쳐 용존 산소를 30%로 유지하는 속도로 용존 산소 센서에 연결된 피드백 루프를 통해 메탄올을 공급하여 탄소 제한을 달성하였다. 질소원으로도 사용되는 수산화암모늄을 자동으로 첨가하여 pH를 7로 유지하였다. 광학 밀도, CFU 수, 전체 브로스 건조 중량 및 유리 포스페이트와 같은 생물공정 매개변수를 정기적으로 측정하였다. 야생형 생물공정에서는 광학 밀도가 ~26에 도달하면 신속한 세포 용해가 발생하였고 광학 밀도의 저하, 콜로니 형성 단위(CFU)의 99% 감소 및 메탄올과 수산화암모늄의 공급 속도를 통해 관찰하였다. AHL 합성효소 유전자가 존재하지 않는 경우, OD 및 CFU는 정지기에 도달할 때 일정하게 유지되었다. 정지기는 유지될 수 있으며, 그 동안 생성물 합성이 발생할 수 있다(도 5).

[0409] **실시예 10: 메틸로바실러스 플라젤라투스 및 메틸로바실러스 글리코게네스에서 EPS 생산 유전자의 확인**

[0410] 생물정보학 분석에 기초하여 파괴를 위해 여러 게놈 좌위를 선택하였다. 메틸로바실러스 플라젤라투스에는 2개의 EPS 관련 유전자 클러스터의 유전적 위치는 이전에 게재되었다(Chistoserdova 등, 2007). 제1 메틸로바실러스 플라젤라투스 EPS 생성 유전자 클러스터(서열번호 113-138)의 유전자에 주석을 달기 위해, 게재된 메틸로바실러스 중 12S 메탄올란(methanolan) 합성 클러스터(Yoshida 등, 2000)를 Python 프로그래밍 언어로 작성된 사용자 정의 스크립트를 사용하여 NCBI BLAST 단백질 검색을 통해 메틸로바실러스 플라젤라투스 게놈과 비교하였다. E-값, 쿼리 범위(query coverage) 및 서열 동일성으로 이루어진 계산된 조합 점수에 기초하여 상위 히트를 선택하였다. 이어서, 각 유전자에 대한 단일 최고 히트를 게놈 서열에 수동으로 배치하고 주석을 달았다. 이러한 최고 히트의 위치는 게재된 제1 클러스터의 위치와 일치하였다. 각 유전자에 대해 명확한 상동체가 발견되지 않았기 때문에 가장 먼 상동체 사이의 모든 유전자는 클러스터의 일부로 간주하였다. 대부분의 주석이 달린 유전자는 당 및 다당류 관련 유전자를 암호화하였다. 동일한 절차를 사용하여 메틸로바실러스 글리코게네스에서 주석이 전혀 없는 EPS 클러스터(서열번호 151-172)를 확인하였다.

[0411] 제2 EPS 관련 클러스터는 메틸로바실러스 플라젤라투스의 게놈 서열(서열번호 139-150)에서 예측하였다. 이들 유전자를 메탄올 클러스터와 비교하는 BLAST 검색을 수행하였지만 명확한 상동체를 찾지 못하였다. 이 클러스터의 각 개별 유전자의 단백질 생성물은 모든 중복되지 않은 단백질 서열에 대한 NCBI 단백질 BLAST 검색을 통해 확인하였으며 각각에 대한 최고 히트는 상술한 바와 같이 선택하였다. 이 메틸로바실러스 플라젤라투스 단백질 클러스터의 각 유전자의 단백질 서열은 NCBI 단백질 BLAST를 사용하여 메틸로바실러스 글리코게네스 게놈에서 교차 검색하였다. 최고 히트는 메틸로바실러스 글리코게네스에서 유사한 클러스터(서열번호 173-198)를 형성하는 것으로 밝혀졌다.

[0412] 각 EPS 관련 유전자 클러스터에서 확인된 오픈 리딩 프레임(ORF)은 아래 표 1 내지 4에 나와 있다.

[0413] 표 1: M. 플라젤라투스에서 EPS 유전자 클러스터 1의 ORF

아미노산 서열 서열번호	뉴클레오티드 서열 서열번호	S12 동족체	예측된 기능/특성
27	113	<i>espA</i>	전사 제어인자, LuxR 계열
28	114	<i>espK</i>	사이클릭 뉴클레오티드 결합 도메인(cNMP-BD) 단백질
29	115	N/A	알려지지 않음
30	116	<i>epsL</i>	엑소소르타제 B 관련 세포외 다당류 생합성 수송체 EpsL
31	117	<i>epsB</i>	트랜스퍼라제 효소 epsB 계열
32	118	<i>epsD</i>	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소, EpsD 계열
33	119	<i>epsE</i>	다당류 배출 단백질 EpsE
34	120	<i>epsF</i>	사슬 길이 결정자 단백질 EpsF
35	121	<i>epsG</i>	사슬 길이 결정자 단백질 티로신 키나제 EpsG
36	122	<i>epsH</i>	엑소소르타제 B
37	123	<i>epsI</i>	EpsI 계열 단백질
38	124	N/A	다당류 생합성 단백질
39	125	N/A	다당류 피루빌 트랜스퍼라제
40	126	N/A	니트로환원효소
41	127	N/A	O-항원 폴리머라제
42	128	<i>epsJ</i>	글리코실 트랜스퍼라제, 계열 2

[0414]

43	129	N/A	글리코실 트랜스퍼라제, 계열 2
44	130	N/A	글리코실 트랜스퍼라제, 그룹 1
45	131	N/A	글리코사이드 가수분해효소, 계열 5
46	132	N/A	글리코실트랜스퍼라제, RfaG
47	133	N/A	만노스-1-포스페이트 구아닐일트랜스퍼라제 (GDP)
48	134	N/A	dTDP-4-데하이드로람노스 환원효소
49	135	N/A	dTDP-4-데하이드로람노스 3,5-에피머라제
50	136	N/A	글루코스-1-포스페이트 티미딜일트랜스퍼라제
51	137	N/A	dTDP-글루코스 4,6-탈수효소
52	138	<i>epsS</i>	UDP-갈락토스 4-에피머라제

[0415]

[0416] 표 2: M. 플라젤라투스에서 EPS 유전자 클러스터 2의 ORF

아미노산 서열 서열번호	뉴클레오티드 서열 서열번호	S12 동족체	예측된 기능/특성
53	139	N/A	만노스-6-포스페이트 이성화효소, 유형 2
54	140	N/A	ABC 수송체 투과효소
55	141	N/A	NDP-핵소스 3-C-메틸트랜스퍼라제 TylCIII
56	142	N/A	GDP-만노스 4,6-탈수효소
57	143	N/A	NAD 의존성 에피머라제/탈수효소
58	144	N/A	글리코실 트랜스퍼라제
59	145	N/A	다당류 배출 단백질
60	146	N/A	글리코실 트랜스퍼라제
61	147	N/A	NAD 의존성 에피머라제/탈수효소
62	148	N/A	당 트랜스퍼라제
63	149	N/A	다당류 생합성 단백질 CapD
64	150	N/A	UDP-글루코스 피로포스포릴라제

[0417]

[0418] 표 3: M. 글리코게네스에서 EPS 유전자 클러스터 2의 ORF

아미노산 서열 서열번호	뉴클레오티드 서열 서열번호	S12 동족체	예측된 기능/특성
65	151	<i>epsA</i>	전사 제어인자, LuxR 계열
66	152	<i>epsL</i>	엑소소르타제 B 관련 세포외 다당류 생합성 수송체 EpsL
67	153	N/A	운데카프레닐-포스페이트 글루코스포스포트랜스퍼라제
68	154	<i>epsD</i>	펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소, EpsD 계열
69	155	<i>epsE</i>	다당류 배출 단백질 EpsE
70	156	<i>epsF</i>	사슬 길이 결정자 단백질 EpsF
71	157	<i>epsG</i>	사슬 길이 결정자 단백질 티로신 키나제 EpsG
72	158	<i>epsH</i>	엑소소르타제 B
73	159	<i>epsI</i>	EpsI 계열 단백질
74	160	<i>epsB</i>	글리코실트랜스퍼라제
75	161	N/A	올리고당 반복 단위 폴리머라제
76	162	N/A	우향 병렬 베타 나선 반복 함유 단백질
77	163	N/A	아실트랜스퍼라제 계열 단백질
78	164	N/A	글리코실트랜스퍼라제 계열 4 단백질
79	165	N/A	글리코실트랜스퍼라제 계열 4 단백질
80	166	N/A	뉴클레오티드 당 탈수소효소
81	167	<i>epsR</i>	알려지지 않음
82	168	N/A	알려지지 않음
83	169	N/A	올리고당 플립파제 계열 단백질
84	170	N/A	다당류 피루빌 트랜스퍼라제 계열 단백질
85	171	N/A	아실트랜스퍼라제
86	172	<i>epsQ</i>	만노스-1-포스페이트 구아닐일트랜스퍼라제/만노스-6-포스페이트 이성화효소

[0419]

[0420] 표 4: M. 글리코게네스에서 EPS 유전자 클러스터 2의 ORF

아미노산 서열 서열번호	뉴클레오티드 서열 서열번호	S12 동족체	예측된 기능/특성
87	173	N/A	MarR 계열 EPS 관련 전사 제어인자
88	174	N/A	GDP-만노스 4,6-탈수효소
89	175	N/A	NAD 의존성 에피머라제/탈수효소 계열 단백질
90	176	N/A	알려지지 않음
91	177	N/A	폴리하이드록시알카노에이트 합성효소 억제인자 PhaR
92	178	N/A	UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피머라제(가수분해) neuC
93	179	N/A	이미다졸 글리세롤 포스페이트 합성효소 하위단위 HisF
94	180	N/A	이미다졸 글리세롤 포스페이트 합성효소 하위단위 HisH
95	181	N/A	N-아세틸 당 아미도트랜스퍼라제
96	182	N/A	다당류 피루빌 트랜스퍼라제 계열 단백질
97	183	N/A	아실트랜스퍼라제
98	184	N/A	알려지지 않음
99	185	N/A	ABC 수송체 ATP 결합 단백질
100	186	N/A	FkbM 계열 메틸트랜스퍼라제
101	187	N/A	글리코실트랜스퍼라제
102	188	N/A	메틸트랜스퍼라제, TIGR04325 계열
103	189	N/A	NAD 의존성 에피머라제/탈수효소 계열 단백질

[0421]

104	190	N/A	DegT/DnrJ/EryC1/StrS 계열 아미노트랜스퍼라제
105	191	N/A	글리코실트랜스퍼라제
106	192	<i>epsI</i>	글리코실트랜스퍼라제
107	193	N/A	글리코실트랜스퍼라제
108	194	N/A	글리코실트랜스퍼라제
109	195	N/A	SDR 계열 산화환원효소
110	196	N/A	당 트랜스퍼라제
111	197	N/A	SDR 계열 NAD(P) 의존성 산화환원효소
112	198	<i>epsT</i>	UTP--글루코스-1-포스페이트 우리딜일트랜스퍼라제 GalU

[0422]

[0423] 표 5: 클러스터의 전체 서열

서열번호	유기체	클러스터	스트랜드
199	M. 플라젤라투스	1	상단
200	M. 플라젤라투스	1	하단
201	M. 플라젤라투스	2	상단
202	M. 플라젤라투스	2	하단
203	M. 글리코게네스	1	상단
204	M. 글리코게네스	1	하단
205	M. 글리코게네스	2	상단
206	M. 글리코게네스	2	하단

[0424]

[0425] 메틸로바실러스 종 균주 12에서 EPS 생산 필수 유전자와의 유사성을 기준으로, *epsD*, *epsE*, *epsF* 및 *epsG*로 주석이 달린 ORF(M. 플라젤라투스의 서열번호 32-35, M. 글리코게네스의 서열번호 68-71)를 결실 대상으로 선택하였다(Yoshida 등, 2003). 제2 EPS 클러스터에는 다른 특성화된 EPS 클러스터에 명확한 상동체가 없었기 때문에, M. 플라젤라투스의 모든 12개의 ORF(서열번호 53-64)와 메틸로바실러스 글리코게네스의 모든 26개의 ORF(서열번호 87-112)를 선택하였다.

[0426] 실시예 11: DNA 결실

[0427] EPS 생산 클러스터 중 하나가 결실되거나 EPS 생산 클러스터가 모두 결실된 ABME 5 및 ABME 6의 변형된 균주를 제조하고 있었다. 게놈 편집은 통합 부위의 업스트림 및 다운스트림에 2kb 길이의 서열이 측면에 있는 카나마이신 또는 리팜피신(rifampicin) 내성 카세트에 이루어진 선형 DNA 단편을 도입함으로써 달성되었다. DNA 단편을 전기천공법에 의해 ABME 5 및 ABMR 6으로 형질전환시켰다. 형질전환을 20g/L 한천, 50 µg/mL 카나마이신 또는 5 µg/mL 리팜피신을 함유하는 선택적 PM7 플레이트 위에 24-48시간 동안 플레이팅하였다. ABME 5 유래 균주를 30 °C에서 인큐베이션하였다. ABME 6 유래 균주를 37°C에서 배양하였다. 올바른 클론은 콜로니 PCR로 확인하였다. DNA 결실에 의해 제조된 균주는 표 6에 나열되어 있다.

[0428] 표 6: 계놈 통합으로 제조된 균주 목록.

균주	종	유전자형	결실된 서열
ABME 5	메틸로바실러스 글리코게네스 DSM 5685	야생형	
ABME 76	메틸로바실러스 글리코게네스 DSM 5685	epsDEFG :: kanR	서열번호 207
ABME 190TH	메틸로바실러스 글리코게네스 DSM 5685	EPS2 :: kanR	서열번호 208
ABME 191TH	메틸로바실러스 글리코게네스 DSM 5685	epsDEFG :: kanR, EPS2 :: rifR	서열번호 207 및 서열번호 208
ABME 6	메틸로바실러스 플라젤라투스 DSM 6875	야생형	
ABME 80	메틸로바실러스 플라젤라투스 DSM 6875	EPS2 :: kanR	서열번호 210
ABME 82	메틸로바실러스 플라젤라투스 DSM 6875	epsDEFG :: kanR	서열번호 209
ABME 131	메틸로바실러스 플라젤라투스 DSM 6875	epsDEFG :: kanR, EPS2 :: rifR	서열번호 209 및 서열번호 210
ABME 145	메틸로바실러스 종 DSM 1758	야생형	

[0429]

[0430] 실시예 12: 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 EPS 유전자 파괴 전후의 진탕 플라스크 배양물 중 총 EPS 측정

[0431] ABME 6에서 EPS 생산 유전자의 결실 효과를 평가하기 위해, 실시예 11에 기술된 바와 같이 3개의 변형된 ABME 6 균주(ABME 80, ABME 82 및 ABME 131)를 제조하고 EPS 생산에 대해 테스트하였다.

[0432] 확인된 형질전환체를 PM7 + 50 µg/mL 카나마이신 한천 플레이트에서 밤새 성장시켰다. 단일 콜로니를 배플링된 (baffled) 250mL 진탕 플라스크 내 25mL의 PM7 배지 + 25 µg/mL 카나마이신에 재현탁시키고 밤새 200rpm에서 인큐베이션하였다. 다음날, 배플링된 250mL 진탕 플라스크 내 50mL의 PM7 배지 + 25 µg/mL 카나마이신에 2.5mL 하룻밤 배양물을 접종하였다. 모든 ABME 5 유래 균주를 30℃에서 배양하고 모든 ABME 6 유래 균주를 37℃에서 배양하였다. 이어서, 배양물을 얼음 위에서 냉각시키고, 2mL 에펜도르프(Eppendorf) 튜브에 분취한 다음 표준 탁상 원심분리기에서 4℃에서 15,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 세포 펠렛 위에 EPS 층이 보이면 이를 다시 상청액에 혼합하였다. EPS 가수분해를 위해 배양물 상청액을 보관하였다. 6M TFA(트리플루오로아세트산) 상청액 부피의 절반을 첨가하여 가수분해를 수행하여 최종 TFA 농도를 3M로 만들었다. 튜브를 120℃로 가열된 썬더블록(thermoblock)에 넣고 6시간 동안 인큐베이션하였다. 가수분해 후, 액체(TFA 포함)를 완전히 건조될 때까지 80℃에서 증발시켰다. 건조 덩어리를 0.5M NaOH(원래 배양물 분취량과 동일한 부피)에 재현탁시키고 HPLC에서 단량체 당에 대해 분석하였다.

[0433] 표 7: 진탕 플라스크 실험에 사용된 PM7 배지의 조성

화합물	1L당
MeOH	10g
KH ₂ PO ₄	0.65g
NA ₂ HPO ₄	1.05g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.1g
NH ₄ Cl	0.2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
TE1 1000X	1mL
d-비오틴	0.1mg
티아민*HCl	0.1mg
리보플라빈	0.1mg
피리독신*HCl	0.1mg
판토텐산염	0.1mg
니코틴아미드	0.1mg
p-아미노벤조산	0.02mg
엽산	0.01mg
비타민 B12	0.01mg
리포산	0.01mg
CaCl ₂ * 2H ₂ O	3.3mg
FeSO ₄ * 7H ₂ O	1.3mg
MnSO ₄ * H ₂ O	0.1mg
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.13mg
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.04mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.04mg
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.04mg
H ₃ BO ₃	0.03mg
pH	7.0
한천(고체 배지용)	20g

[0434]

[0435]

ABME 6은 원심분리 후 세포 펠렛 위에 눈에 보이는 점액층을 생성했으며, 이는 가수분해 후 ~ 1g/L의 총 단량체 당에 해당한다. 단일 클러스터 파괴(ABME 80 및 ABME 82) 시 눈에 보이는 점액층은 없었지만 여전히 ~ 500mg/L의 총 당이 생성되었다. 흥미롭게도, 글루코스 대 총 당 비율은 어떤 유전자 클러스터가 파괴되었는지에 따라 반전되는데, 이는 생성되는 두 가지 상이한 유형의 EPS로 인해 발생했을 가능성이 높다. 두 클러스터가 모두 파괴되었을 때(ABME 131 균주) 당은 검출 한계 미만이었다.

[0436]

실시예 13: EPS 유전자 파괴 전후의 메틸로바실러스 플라젤라투스의 반응기 배양물에서의 점도 측정

[0437]

EPS 생산 중단 전후의 발효액 점도 변화를 평가하기 위해, 산소 제한 하에 5리터 생물반응기 발효에서 균주를 비교하였다. 생물반응기 종자 배양물은 항상 다음과 같이 제조하였다. 250mL의 배플링된 진탕 플라스크 내 25mL의 PM7 배지에 250uL의 균주 극저온 스톡(cryo-stock)을 접종하고 스톡 OD를 5로 조정하여 0.05의 시작 OD를 생성하였다. 배양물을 200rpm, 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 아침에, 2L의 배플링된 진탕 플라스크 내 200mL의 PM7 배지에 하룻밤 배양물의 10%(20mL)를 접종하고 OD ~1(+/- 0.2)까지 성장시켰다. 이어서, 배양물을 사용하여 5L 생물반응기(8% 접종원(inoculum))에 2.5L의 시작 부피의 멸균 PM3 배지를 접종하였다. NH₄OH를 자동으로 첨가하여 pH를 7로 유지하고 온도를 37℃로 유지하였다.

[0438]

산소 제한 공정의 경우, 3 내지 6g/L의 농도를 유지하기 위해 메탄올을 자동으로 공급하였다. 반응기 폭기 및 교반은 최대로 유지하였지만 공정 중에 산소 농도는 항상 0%로 떨어졌다. OD, 미네랄 및 대사산물 측정을 위해 브로스를 정기적으로 샘플링하였다. 점도는 공정 마지막에 측정하였으며 결과는 도 7에 요약되어 있다. 야생형 M. 플라젤라투스 발효액은 샘플링 당시 400센티푸아즈로 점성이 매우 높았다. 메틸로바실러스의 상이한 종인 ABME 145도 측정하였으며 422센티푸아즈의 비슷한 점성 브로스가 생성되었다. 이중 파괴로 눈에 띄게 덜 점성인 브로스가 생성되었으며, 이는 표준 탁상 장비를 사용하여 원심분리하고 여과할 수 있었다 - 이는 이전 샘플에서는 불가능했던 일이다. 점도계로 점도가 35cP 또는 거의 10배 감소한 것으로 측정하여 이러한 평가를 확인하였

다. 비교를 위해 대장균 발효액의 대표적인 샘플도 측정하였다.

- [0439] **실시예 14:** 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 EPS 유전자 제거 전후의 진탕 플라스크에서 거품 발생 감소 측정
- [0440] EPS 결핍 균주가 거품 발생이 현저히 적은 것을 관찰하였다. ABME 6의 거품 형성을 EPS 결핍 돌연변이 균주 (ABME 82 및 ABME 131)와 비교하기 위해 실시예 12에 기술된 바와 같이 균주를 배양하였다.
- [0441] 거품 형성을 측정하기 위해 플라스크를 진탕기에서 꺼내고 액체를 5분 동안 정치시켰다. 액체 위의 거품층을 줄자로 측정하였다(도 8). 야생형 배양물은 액체 위에 0.5 - 1cm의 거품층을 생성한 반면 단일 클러스터 파괴는 액체 메니스커스에 ~1mm의 거품만 축적하였다. 이중 파괴 배양물에서는 거품이 전혀 보이지 않았다.
- [0442] **실시예 15:** 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 EPS 유전자 파괴 전후의 생물반응기 배양에서 거품 발생 감소 측정
- [0443] EPS 생산 중단 전후의 발효액 거품 발생의 변화를 평가하기 위해, 균주를 5리터 생물반응기 발효로 비교하였다. 거품 형성량은 첨가된 소포제(SAG 5693)의 양으로 근사화하였다. 발효는 탄소 제한 하에 수행하였다.
- [0444] 반응기는 실시예 12에 기술된 바와 같이 접종하였다. 탄소 제한을 달성하기 위해, 최고 폭기 및 교반 설정에서 pO₂ 값을 약 30%로 유지하는 동적 계산된 속도로 50% 메탄올을 자동으로 반응기에 공급하였다. 첨가된 메탄올은 즉시 소비되어 검출 수준 이하로 유지되었다. 거품이 발효액 메니스커스 위에 위치한 검출기에 도달하면 소포제가 자동으로 첨가되었다. ABME 6 및 ABME 131을 이 방식으로 테스트하였다. ABME 131의 경우 소포제 첨가는 5시간 후에 시작하였다. 발효 시간에 따라 ABME 131 발효에서는 소포제가 약 60% 적게 첨가되었다(도 9).
- [0445] **실시예 16:** EPS가 없는 M. 플라젤라투스의 개선된 메탄올 내성
- [0446] 높은 메탄올 농도에 대한 내성은 효율적인 생물공정을 위한 중요한 매개변수이다. EPS를 생산할 수 없는 균주에서 메탄올 내성이 감소하지 않았는지 확인하기 위해 ABME 6 및 이의 EPS 생산 파생 균주 ABME 131의 메탄올 농도 증가에 따른 성장을 테스트하였다.
- [0447] 실시예 13에 기술된 바와 같이 균주를 진탕 플라스크에서 테스트하였다. 메탄올 내성을 테스트하기 위해, 초기 메탄올 농도를 4.5%까지 증가시켰다. OD600을 24시간 후에 측정하였다.
- [0448] 놀랍게도, ABME 131의 메탄올 내성은 ABME 6과 비교하여 더 높았다. 예를 들어, 2.75%의 초기 메탄올 농도에서 EPS가 없는 ABME 131은 OD600 1.6까지 성장한 반면, 야생형 ABME 6은 OD600 0.3까지만 성장하였다. 성장률 차이는 2.75%에서 가장 두드러졌다. 그러나 ABME 6과 비교하여 ABME 131의 개선된 성장은 모든 메탄올 농도에서 명백하였다(도 11).
- [0449] **실시예 17:** 종결자 삽입에 의한 전사 수준에서 폴리포스페이트 키나제의 파괴.
- [0450] RNA 폴리머라제가 유전자를 mRNA로 전사시키기 위해서는 프로모터 서열이 필요하다. RNA 폴리머라제가 종결자 서열에 도달하면 전사가 종료되어 전사 복합체로부터 방출된다. 따라서, 유전자의 전사는 프로모터 서열을 제거하거나 유전자 앞이나 내부에 종결자 서열을 삽입함으로써 중단될 수 있다. 이러한 개입 모두는 람다 종결자와 같은 종결자 서열(서열번호 230)을 유전자 바로 앞에 삽입함으로써 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 수행된다. 이로 인해 RNA 폴리머라제가 유전자를 성공적으로 전사하기 전에 방출된다. 간략하게, ppk 유전자 업스트림의 2000개의 염기쌍 서열 및 상기 유전자 내의 2000개의 염기쌍 서열을 PCR을 통해 계놈 DNA로부터 증폭시킨다. 단편은 3' 말단에 종결자 서열이 있는 항생제 내성 카세트에 첨부된다. 시작 코돈 바로 앞에 종결자가 있는 ppk 유전자의 처음 2000bp를 함유하는 생성된 선형 작제물은 전기천공법으로 메틸로바실러스 균주로 형질전환시킨다. 메탄올을 탄소원으로 하는 항생제 함유 최소 배지 한천 플레이트의 선택 단계를 사용하여 성공적인 형질전환체를 확인한다. 올바른 좌위로의 DNA 통합은 콜로니 PCR로 확인한다. 통합 후 전체 영역은 계놈으로부터 증폭되고 DNA 시퀀싱을 통해 종결자 서열이 염색체 내 유전자의 바로 업스트림에 위치하는지 확인된다.
- [0451] **실시예 18:** 리보솜 결합 부위의 돌연변이에 의한 번역 수준에서 폴리포스페이트 키나제 발현의 파괴.
- [0452] 리보솜이 전사된 mRNA 분자에 결합하고 번역을 시작하려면 16S 리보솜 하위단위의 3' 말단에 상보적인 6개의 뉴클레오타이드로 구성된 리보솜 결합 부위(RBS)가 필요하다. 번역 수준은 RBS에 대한 16S 리보솜 하위단위의 친화도에 따라 달라진다. 메틸로바실러스 플라젤라투스의 최적 결합 친화력은 16S 리보솜 하위단위의 서열(서열번호 228)에 기초한 "AGGAGA"의 RBS를 사용하여 달성된다. RBS를 "AT AT AT"와 같은 저친화도 서열로 교체하면 단백질 발현이 낮아진다. 이러한 치환은 상동성 재조합에 의해 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 수행된다. 유전자의 정확한 RBS를 예측하기 어렵기 때문에 ppk 유전자의 시작 코돈 앞의 20개의 염기쌍이 10개의 "AT" 반복으

로 대체된다. 간략하게, ppk 유전자 업스트림의 2000개의 염기쌍 서열 및 상기 유전자 다운스트림의 2000개의 염기쌍 서열을 PCR을 통해 게놈 DNA로부터 증폭시킨다. 단편은 자체 프로모터, 종결자 및 리보솜 결합 부위를 함유하는 음성 선택 마커뿐만 아니라 항생제 내성 카세트에 첨부된다. 생성된 선형 작제물은 전기천공법을 통해 메틸로바실러스 균주로 형질전환되어 원래의 ppk를 결실한다. 메탄올을 탄소원으로 하는 항생제 함유 최소 배지 한천 플레이트의 선택 단계를 사용하여 성공적인 형질전환체를 확인한다. 올바른 좌위로의 DNA 통합은 콜로니 PCR로 확인한다. 통합 후 전체 영역을 게놈으로부터 증폭시키고 DNA 시퀀싱으로 확인한다. 이어서, 시작 코돈 앞의 20개의 "A" 반복을 포함하는 프라이머를 사용하여 야생형 M. 플라젤라투스의 게놈으로부터 ppk 서열을 PCR로 증폭시켜 제2 선형 단편을 제조한다. 이어서, "A" 반복이 있는 ppk 유전자는 2000bp 업스트림 및 다운스트림 단편과 결합되어 결실 균주로 형질전환된다. 성공적인 형질전환체는 변형된 서열을 선호하여 원래의 내성 카세트를 제거한 세포만 생존하여 콜로니를 형성하는 음성 선택 마커를 사용하여 스크리닝한다. 마지막으로, 20개의 "AT" 반복의 통합은 DNA 시퀀싱으로 확인된다.

[0453] **실시예 19:** 프레임 이동 돌연변이에 의한 단백질 기능 수준 유전자에서 폴리포스페이트 키나제의 파괴.

[0454] 프레임 이동 돌연변이는 3으로 나눌 수 없는 임의 개수의 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실로 인해 발생한다. 그 결과 리딩 프레임이 이동되어 번역된 단백질의 아미노산 서열이 완전히 바뀌어 기능하지 않게 된다. 먼저 천연 ppk 서열을 결실시킨 후 이를 4 위치(정지 코돈 바로 뒤)의 "T" 뉴클레오티드가 제거된 변형된 DNA 서열(서열번호 229)로 대체함으로써 메틸로바실러스 플라젤라투스에서 프레임 이동 돌연변이를 수행한다. 간략하게, ppk 유전자 업스트림의 2000개의 염기쌍 서열 및 상기 유전자 다운스트림의 2000개의 염기쌍 서열을 PCR을 통해 게놈 DNA로부터 증폭시킨다. 단편은 자체 프로모터, 종결자 및 리보솜 결합 부위를 함유하는 음성 선택 마커뿐만 아니라 항생제 내성 카세트에 첨부된다. 생성된 선형 작제물은 전기천공법으로 메틸로바실러스 균주로 형질전환시켜 원래의 ppk를 결실시킨다. 메탄올을 탄소원으로 하는 항생제 함유 최소 배지 한천 플레이트의 선택 단계를 사용하여 성공적인 형질전환체를 확인한다. 올바른 좌위로의 DNA 통합은 콜로니 PCR로 확인한다. 통합 후 전체 영역을 게놈으로부터 증폭시키고 DNA 시퀀싱으로 확인한다. 이어서, ppk 유전자의 4 위치에서 "T"를 제외하는 프라이머를 사용하여 야생형 M. 플라젤라투스의 게놈으로부터 ppk 서열을 PCR로 증폭시켜 제2 선형 단편을 제조한다. 변형된 ppk 유전자는 2000bp 업스트림 및 다운스트림 단편과 결합되어 결실 균주로 형질전환된다. 성공적인 형질전환체는 변형된 서열을 선호하여 원래의 내성 카세트를 제거한 세포만 생존하여 콜로니를 형성하는 음성 선택 마커를 사용하여 스크리닝한다. 마지막으로, 20개의 "AT" 반복의 통합은 DNA 시퀀싱으로 확인된다.

[0455] **실시예 20:** ppK 파괴 유무에 따른 메틸로바실러스 균주의 발효, 바이오매스 생산 비교.

[0456] ppK 유전자가 있거나 없는 **메틸로바실러스** 균주를 사용하여 병렬 생물반응기 발효를 수행하였다. KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄, NH₄SO₄ 및 미량원소 혼합물을 포함하는 미네랄 배지를 사용하였다. 메탄올 농도는 온라인 독점 메탄올 센서를 사용하는 피드백 루프를 통해 발효 전반에 걸쳐 4-5g/L로 동적으로 유지하였다. 질소원으로도 사용되는 수산화암모늄을 자동으로 첨가하여 pH를 7로 유지하였다. 광학 밀도, CFU 수, 전체 브로스 건조 중량 및 유리 포스페이트와 같은 생물공정 매개변수를 정기적으로 측정하였다. 비-ppK 결실 생물공정에서 광학 밀도가 ~30에 도달할 때 신속한 세포 용해가 발생했으며 광학 밀도의 저하, 콜로니 형성 단위(CFU)의 99% 감소 및 메탄올과 수산화암모늄의 공급 속도를 통해 관찰하였다. ppK 유전자가 존재하지 않는 경우, 광학 밀도는 ~45-50의 더 높은 값에 도달하였고, CFU는 정지기에 도달할 때 일정하게 유지되었으며 공급 속도의 급격한 감소가 관찰되지 않았는데, 이는 정지기 동안 세포가 대사적으로 활성 상태를 유지했음을 나타낸다. 정지기는 며칠 동안 유지될 수 있으며, 그 동안 생성물 합성이 발생할 수 있다(도 2).

[0457] **설명에 인용된 참고문헌 목록**

[0458] Pennacchietti E, Lammens TM, Capitani G, Franssen MC, John RA, Bossa F, De Biase D., 2009. Mutation of His465 alters the pH-dependent spectroscopic properties of Escherichia coli glutamate decarboxylase and broadens the range of its activity toward more alkaline pH. J Biol Chem. 284(46):31587-96. doi: 10.1074/jbc.M109.049577.

[0459] Thu Ho, N.A., Hou, C.Y., Kim, W.H., Kang, T.J., 2013. Expanding the active pH range of Escherichia coli glutamate decarboxylase by breaking the cooperativeness. J. Biosci. Bioeng. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.09.002>

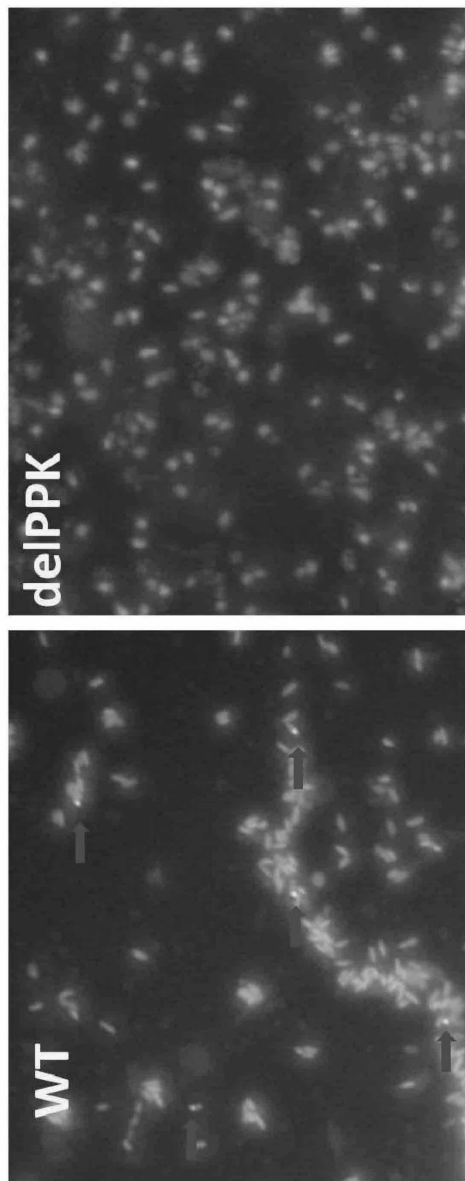
[0460] Yu, K., Lin, L., Hu, S., Huang, J., Mei, L., 2012. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from Lactobacillus brevis CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH. Enzyme Microb.

Technol. 50, 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.010>

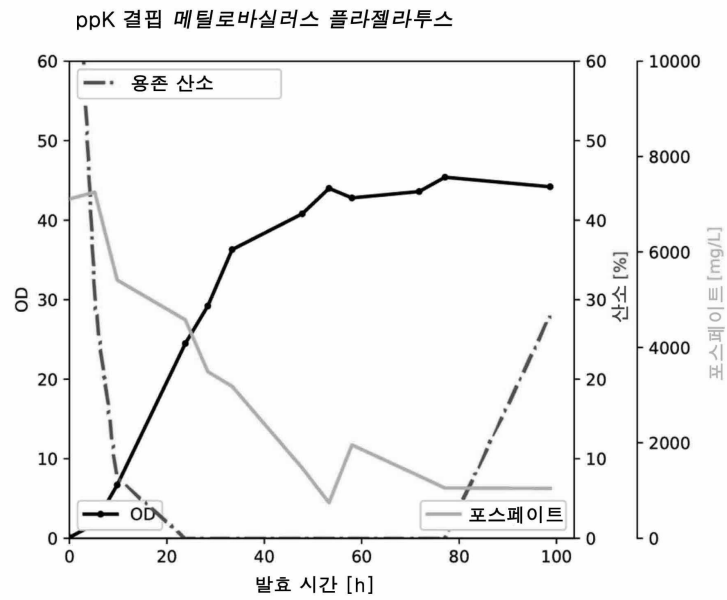
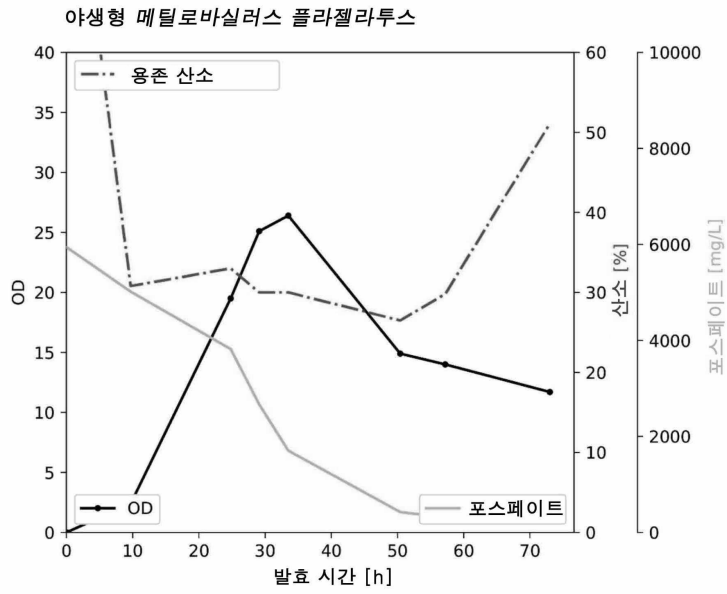
- [0461] Blin, K. 등 (2021) "antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities", *Nucleic Acids Res.*, 49(W1): W29-W35. doi: 10.1093/nar/gkab335.
- [0462] Chistoserdova, L. 등 (2007) 'Genome of *Methylobacillus flagellatus*, Molecular Basis for Obligate Methylophily, and Polyphyletic Origin of Methylophily', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology Journals, 189(11): 4020-4027.
- [0463] Yoshida, T. 등 (2000) 'Saccharide production from methanol by transposon 5 mutants derived from the extracellular polysaccharide-producing bacterium *Methylobacillus* sp. strain 12S', *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s002530000407.
- [0464] Yoshida, T. 등 (2003) 'Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylophile *Methylobacillus* sp. strain 12S', *Microbiology*. Microbiology Society, pp. 431-444. doi: 10.1099/mic.0.25913-0.
- [0465] Qiu Z and Goodman MF: The *Escherichia coli* polB locus is identical to dinA, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a polB mutant. *J Biol Chem.* 1997, 272(13): 8611-8617.
- [0466] Kwon DH, ^{Peña} JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J: Frameshift mutations in rdxA and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46(5): 793-796
- [0467] Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:6640-6645.
- [0468] Zhu Y, Huang W, Lee SS, Xu W. Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO Rep.* 2005; 6(7):681-7.
- [0469] Tzeng CM, Kornberg A. The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. *J Biol Chem.* 2000; 275(6):3977-83.

도면

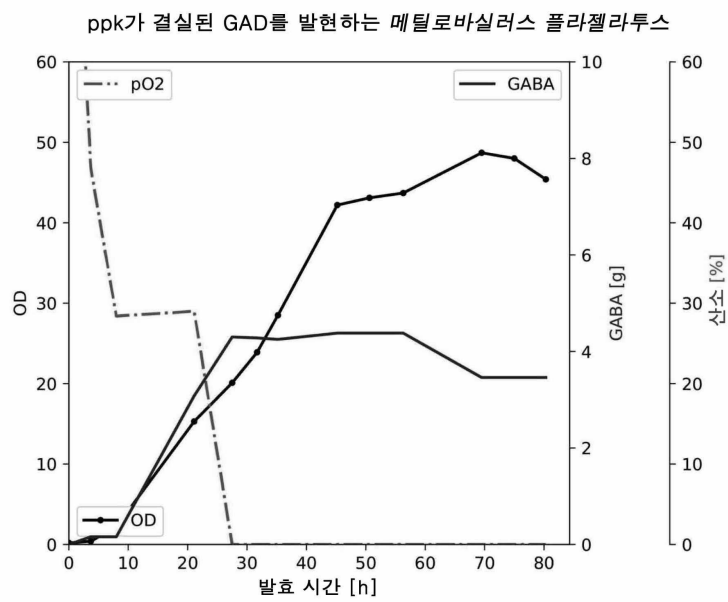
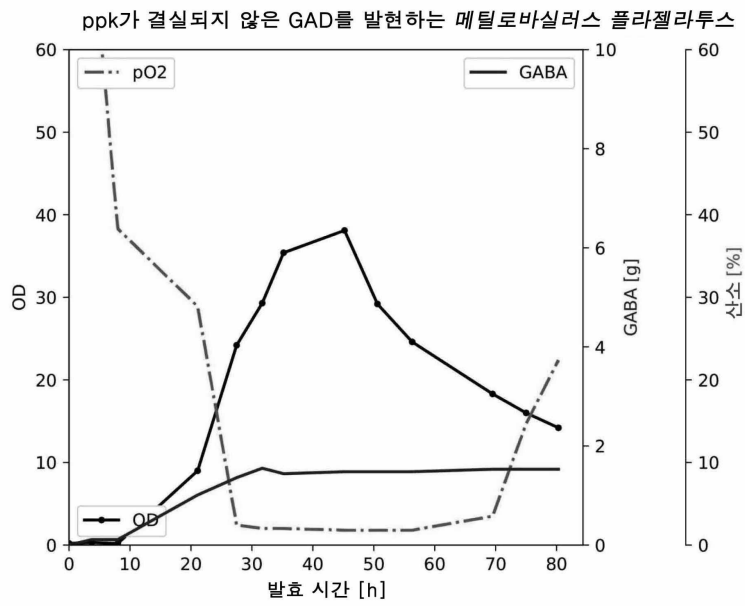
도면1



도면2

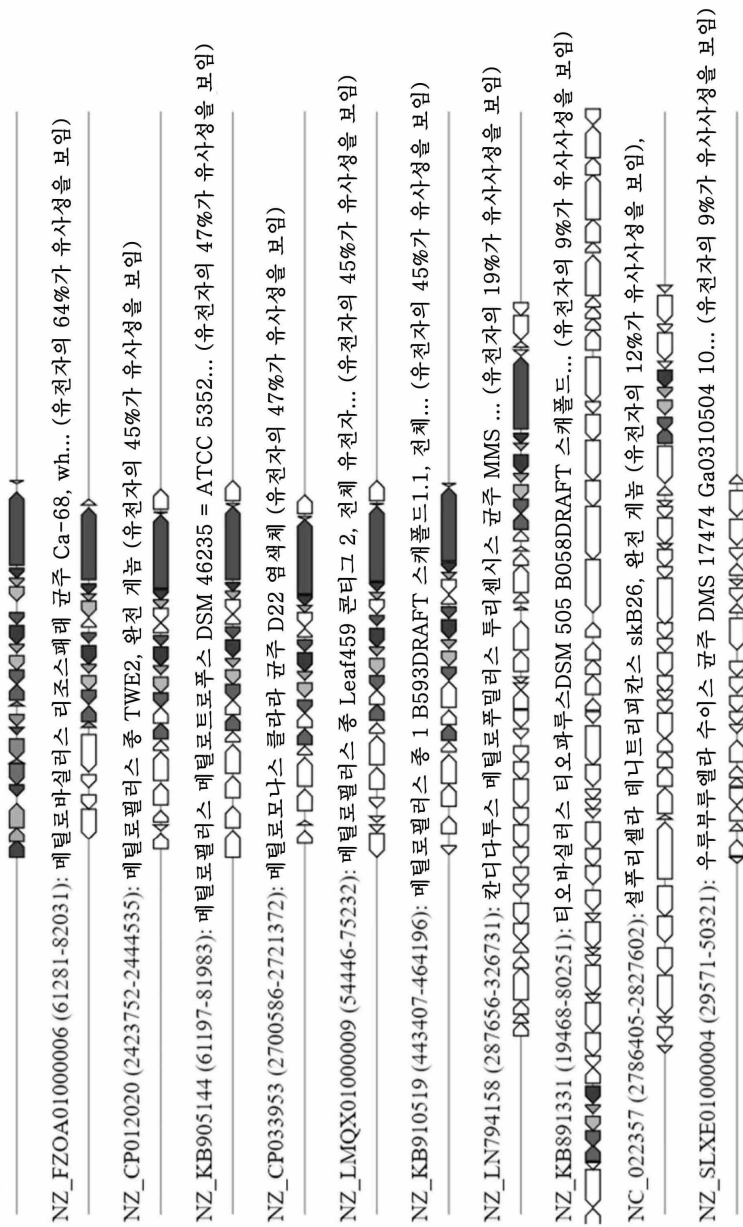


도면3

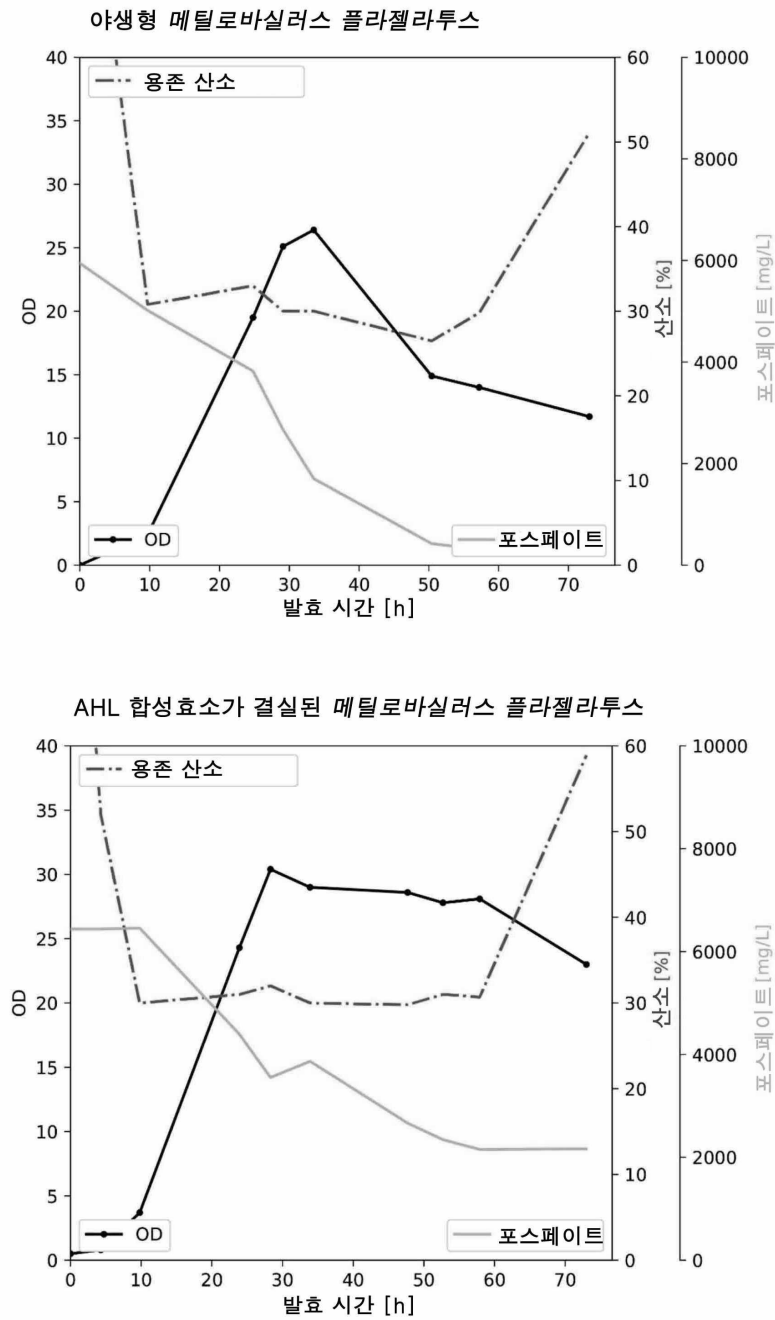


도면4

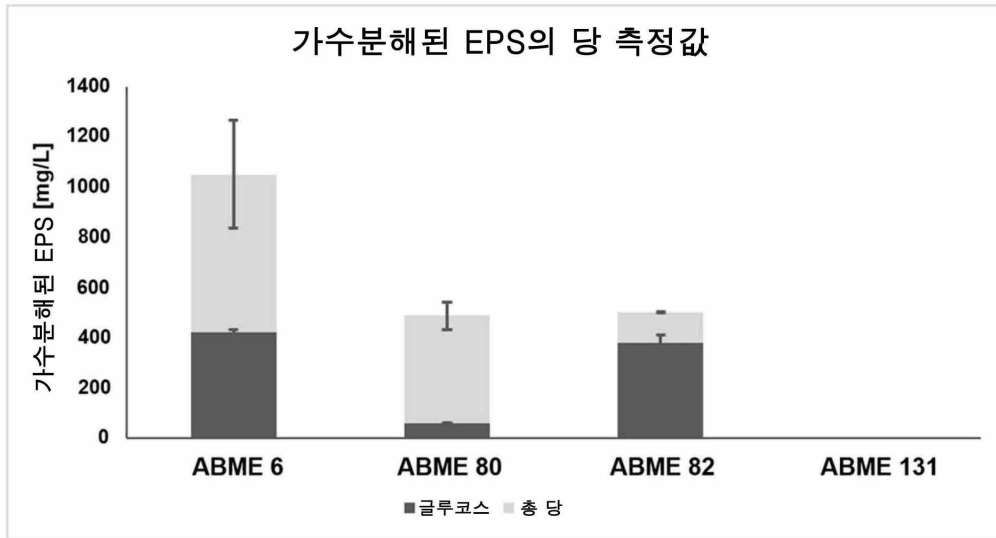
쿼리 서열



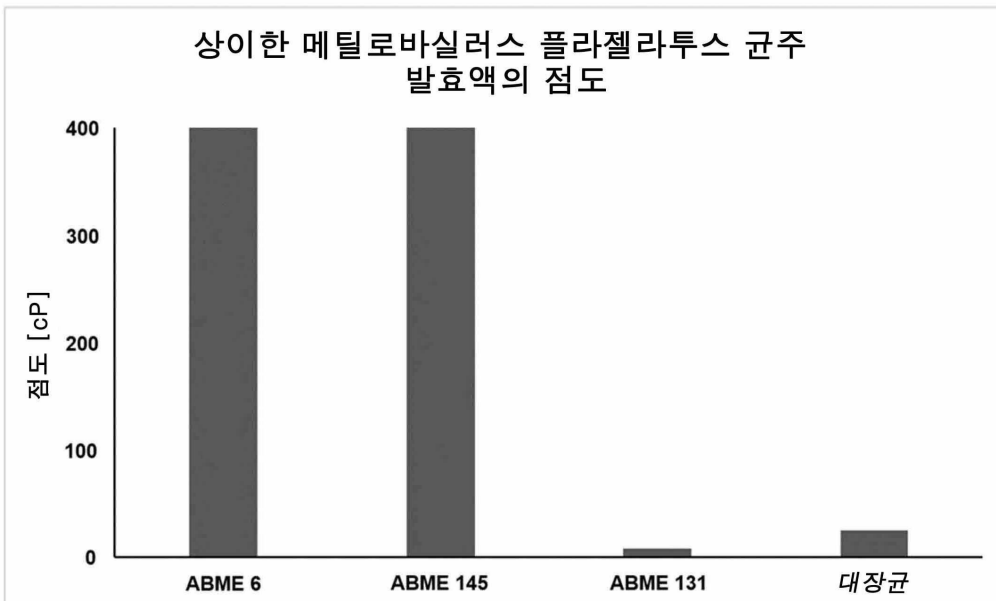
도면5



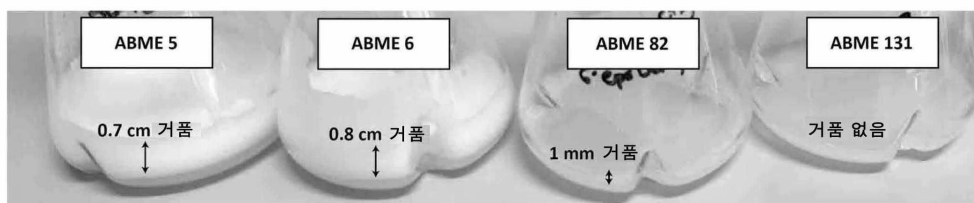
도면6



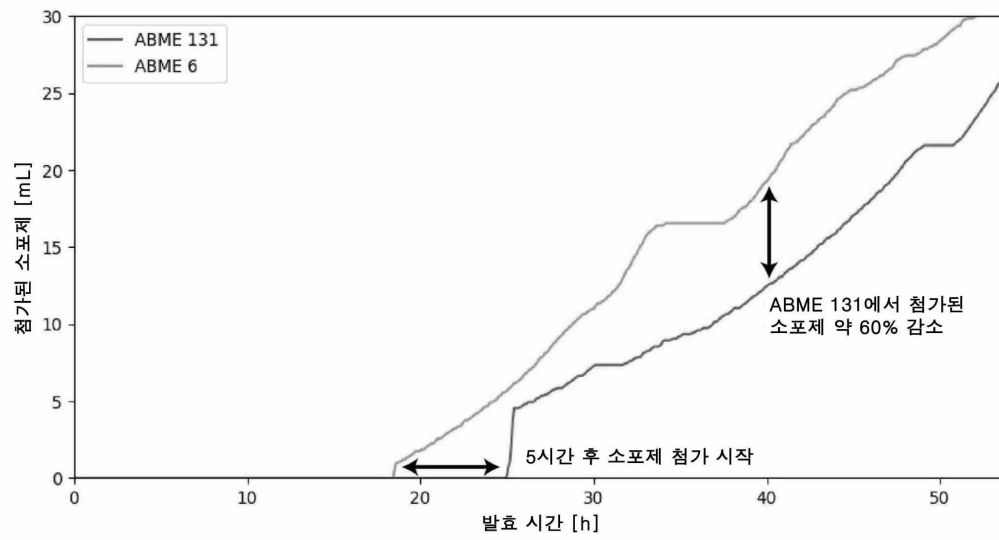
도면7



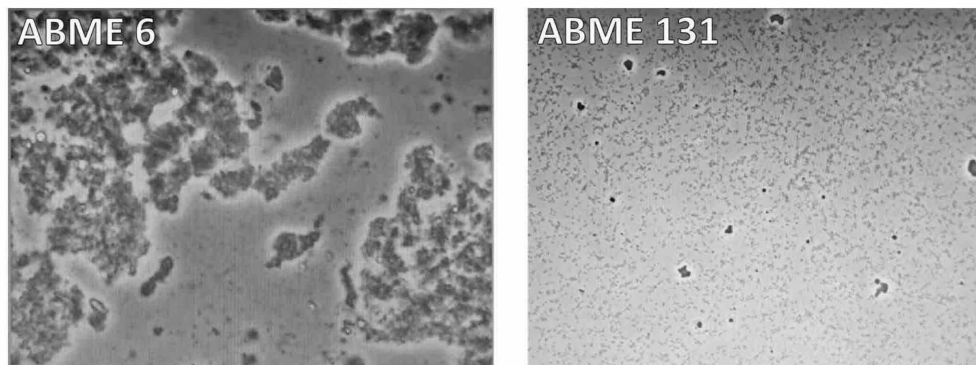
도면8



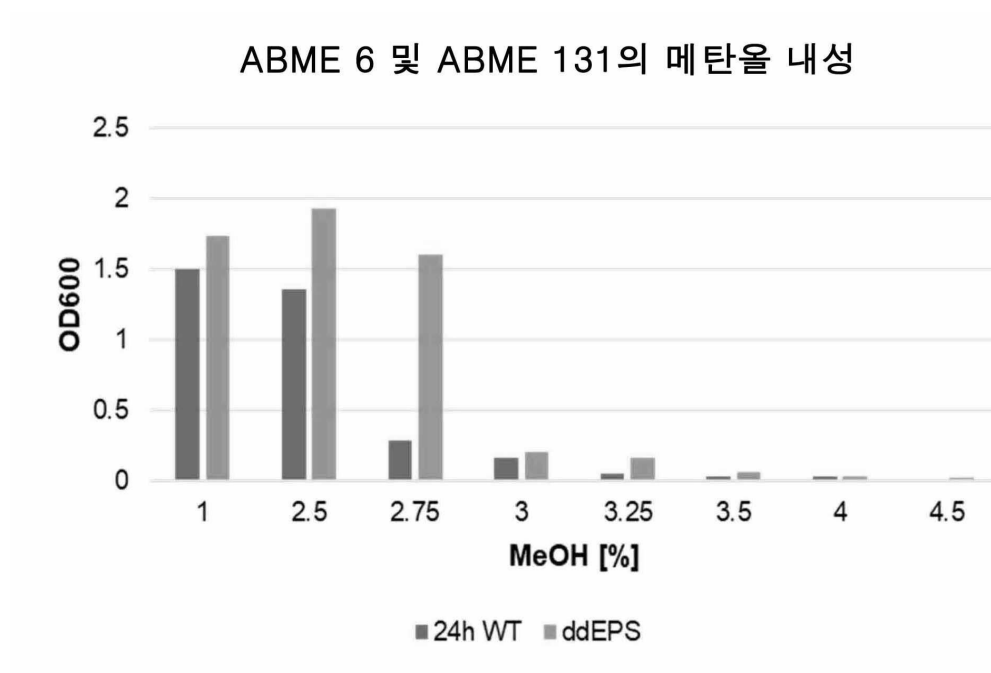
도면9



도면10



도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.